

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Untersuchungen zum Vorkommen von psychrophilen und
psychrotrophen *Clostridium* spp. in fleischverarbeitenden
Betrieben**

von Susanne Christine Eckardt
aus Hof
München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis

Angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Max Rubner-Institut, Kulmbach
Mentor: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München**

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis
Korreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin P. Märtlbauer

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Meiner Familie, Johannes und Dr. Peter Kanzler

1	EINLEITUNG.....	1
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	Rindfleischerzeugung in Deutschland.....	3
2.1.1	Haltungsformen und Marktbedeutung	3
2.1.2	Strukturwandel der fleischverarbeitenden Betriebe	5
2.1.3	Technologie der Schlachtung und Zerlegung des Rindes	6
2.1.4	Hygiene und kritische Kontrollpunkte bei der Rinderschlachtung und -zerlegung	10
2.1.5	Reinigung und Desinfektion in fleischverarbeitenden Betrieben.....	12
2.2	Verderb von Rindfleisch.....	17
2.2.1	Allgemeine aerobe und anaerobe Verderbsmikrobiota auf Rindfleisch	17
2.2.2	Eintragsquellen von Verderbserregern in Schlachtbetriebe	19
2.2.3	Psychrotolerante <i>Clostridium</i> spp.....	21
2.2.3.1	Vorkommen psychrophiler und psychrotropher <i>Clostridium</i> spp.....	21
2.2.3.2	<i>Clostridium estertheticum</i> und <i>Clostridium estertheticum</i> -like Organismen.....	24
2.2.3.3	Verderb durch psychrotolerante <i>Clostridium</i> spp.....	26
2.3	Nachweis von psychrotoleranten <i>Clostridium</i> spp.....	32
2.3.1	Kultureller Nachweis von psychrotoleranten <i>Clostridium</i> spp	32
2.3.2	Molekularbiologischer Nachweis von psychrotoleranten <i>Clostridium</i> spp ..	34
2.3.3	Typisierung und Sequenzierung von psychrotoleranten <i>Clostridium</i> spp ...	36
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	38
3.1	Material	38
3.1.1	Bakterienstämme	38
3.1.2	Probenmaterial - Tupferproben	40
3.1.3	Kulturelle Verfahren.....	40
3.1.4	Polymerasekettenreaktion.....	43
3.1.5	Sonstige Materialien und Geräte.....	44
3.2	Methoden.....	45
3.2.1	Vergleich psychrotoleranter <i>Clostridium</i> spp	45
3.2.1.1	Kultivierungsbedingungen	45

3.2.1.2	Mikroskopische Untersuchung	47
3.2.1.2.1	Lichtmikroskopie.....	47
3.2.1.2.2	Elektronenmikroskopie	47
3.2.2	PCR-Entwicklung zum Nachweis von <i>C. bowmanii</i> , <i>C. frigidis</i> und <i>C. gasigenes</i>	48
3.2.2.1	PCR-System und Primer	48
3.2.2.2	Überprüfung der Spezifität.....	51
3.2.2.3	Nachweisrate für vegetative Zellen der Clostridien im Fleischtropf- saft.....	55
3.2.2.4	Nachweisrate für Sporen der Clostridien im Fleischtropfsaft	58
3.2.3	Psychrotolerante <i>Clostridium</i> spp. in fleischverarbeitenden Betrieben.....	59
3.2.3.1	Inokulationsversuche – Etablierung der Methode.....	59
3.2.3.2	Probenahme in fleischverarbeitenden Betrieben.....	61
3.2.3.3	Betrieb A.....	62
3.2.3.3.1	Ausgangssituation	62
3.2.3.3.2	Maßnahmen in Betrieb A	65
3.2.3.4	Betrieb B.....	66
3.2.3.4.1	Ausgangssituation	66
3.2.3.4.2	Maßnahmen in Betrieb B	68
3.2.3.5	Betrieb C	68
3.2.3.5.1	Ausgangssituation	68
3.2.3.5.2	Maßnahmen in Betrieb C.....	70
4	ERGEBNISSE.....	71
4.1	Vergleich psychrotoleranter <i>Clostridium</i> spp	72
4.1.1	<i>C. bowmanii</i>	72
4.1.2	<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i>	73
4.1.3	<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i>	74
4.1.4	<i>C. estertheticum</i> -like Isolat C 194.....	75
4.1.5	<i>C. frigidis</i>	76
4.1.6	<i>C. gasigenes</i>	77
4.2	PCR-Entwicklung zum Nachweis von <i>Clostridium</i> spp.....	78
4.2.1	PCR zum Nachweis von <i>C. bowmanii</i>	78
4.2.2	PCR zum Nachweis von <i>C. frigidis</i>	81

4.2.3	PCR zum Nachweis von <i>C. gasigenes</i>	87
4.3	Psychrotolerante <i>Clostridium</i> spp. in fleischverarbeitenden Betrieben.	93
4.3.1	Inokulationsversuche – Kunststoff- und Edelstahloberflächen	93
4.3.2	Betrieb A.....	96
4.3.2.1	Ausgangssituation	96
4.3.2.2	Situation nach Behandlung mit peressigsäurehaltigem Desinfektionsmittel	100
4.3.2.3	Zwischenstatus.....	102
4.3.2.4	Situation nach Grundsanierung	104
4.3.3	Betrieb B	105
4.3.3.1	Ausgangssituation	105
4.3.3.2	Situation nach Behandlung mit peressigsäurehaltigem Desinfektionsmittel	107
4.3.4	Betrieb C	107
4.3.4.1	Ausgangssituation	107
4.3.4.2	Situation nach Vernebelung mit einem kationischen Polymer aus der Gruppe der Guanidine	111
4.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	113
5	DISKUSSION	114
6	ZUSAMMENFASSUNG	142
7	SUMMARY	144
8	LITERATURVERZEICHNIS	146
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	162
10	TABELLENVERZEICHNIS	166
11	ANHANG.....	169
12	DANKSAGUNG	171

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaare
BSE	Bovine Spongiforme Encephalopathie
C.	<i>Clostridium</i>
CBA	Columbia Blutagar
CE	<i>Clostridium estertheticum</i>
CEE	<i>Clostridium estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i>
CEL	<i>Clostridium estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i>
CE-L	<i>Clostridium estertheticum</i> -like Organismus
d	Tag (e)
DHL-Agar	Desoxycholate Hydrogen Sulfide Lactose Agar
DIN	Deutsches Institut für Normung
DLG	Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e. V.
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonucleotidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
E.	<i>Escherichia</i>
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EU	Europäische Union
g	Gramm
h	Stunde (n)
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
ITS	Internal Transcribed Spacer
KbE	Koloniebildende Einheiten
kg	Kilogramm
l	Liter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minute (n)
ml	Milliliter

mm	Millimeter
MRI	Max Rubner Institut
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerasekettenreaktion)
präred.	präreduziert
PY	Pepton Yeast
PYGS	Pepton Yeast Glucose Starch
QPCR	quantitative real-time PCR
RCM	Restricted Clostridial Medium
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
s	Sekunde
sp, spp	Spezies (singular/plural)
subsp.	subspezies
V	Volt
vgl.	vergleiche

1 EINLEITUNG

Aufgrund moderner Vermarktungsprozesse und teilweise langer Transportwege zum Bestimmungsort wird hochwertiges Rindfleisch heutzutage überwiegend vakuumverpackt und in der Verpackung gereift. Ende der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts wurden die ersten Fälle von „Blown Pack Spoilage“ beobachtet. Dabei handelt es sich um eine Verderberscheinung, bei der es zum Aufgasen der Verpackung von gelagertem, vakuumiertem Rindfleisch kommt. Diese Form des Verderbs tritt seitdem mit zunehmender Häufigkeit auf. Blown Pack Spoilage wird durch kälteliebende Clostridien verursacht und tritt bei intakter Kühlkette und teilweise deutlich vor Ablauf der üblichen Haltbarkeitsfristen auf.

Als häufigster Verursacher gilt *Clostridium (C.) estertheticum*, mit seinen beiden Subspezies *estertheticum* und *laramiense*. Daneben wurden mit den sogenannten *C. estertheticum*-like Organismen und *C. gasigenes* weitere Verursacher dieses Verderbsgeschehens identifiziert. In den letzten Jahren wurde eine Reihe weiterer psychrotoleranter Clostridien auf Fleisch und in der Umgebung von fleischverarbeitenden Betrieben nachgewiesen, deren Bedeutung als Verderbsverursacher zum Teil jedoch noch ungeklärt ist.

Inzwischen ist der Fleischverderb durch psychrotolerante Clostridien aufgrund hoher finanzieller Verluste zu einem weltweiten Problem geworden.

Über die Eintragsquellen und Kontaminationswege dieser Mikroorganismen liegen bisher keine gesicherten Erkenntnisse vor. Die Untersuchungsergebnisse vorangegangener Arbeiten deuten darauf hin, dass die Bakterien in Form von Sporen über Fell und Fäzes der Schlachttiere in die fleischverarbeitenden Betriebe eingebracht werden (Broda et al., 2009; Moschonas et al., 2009; Moschonas et al., 2011b).

Der Schwerpunkt bisheriger Studien, die in Deutschland zum Thema kälteliebende Clostridien und Blown Pack Spoilage durchgeführt wurden, lag auf dem Nachweis von *C. estertheticum* auf frischem Fleisch und der Wirksamkeit verschiedener Desinfektionsmittel auf diesen Keim (Böhm, 2013; Ziegler, 2009).

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mehr Erkenntnisse über das Vorkommen und die Verbreitung von psychrotoleranten Clostridien in fleischverarbeitenden Betrieben zu erlangen. In der vorliegenden Arbeit wurden drei europäische fleischverarbeitende Betriebe unterschiedlicher Struktur auf das

Vorkommen von *C. estertheticum*, *C. estertheticum*-like Organismen, *C. gasigenes*, *C. bowmanii* und *C. frigoris* untersucht. Dazu wurden zwei PCR-Systeme zum Nachweis von *C. bowmanii* und *C. frigoris* entwickelt und das PCR-System zum Nachweis von *C. gasigenes* (Broda et al., 2003a) durch Verwendung eines neuen Primers modifiziert.

Um die Nachweisbarkeit von Clostridiensporen mittels Wattetupferproben von verschiedenen, häufig in der Fleischindustrie benutzten Oberflächen zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst Inokulationsversuche durchgeführt.

Zusätzlich wurde anhand zeitlich versetzter Untersuchungen der Betriebe die Wirksamkeit unterschiedlicher Reinigungs- und Desinfektionsverfahren hinsichtlich der Eliminierung dieser psychrotoleranten Clostridien aus dem Betriebsumfeld getestet.

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem ein Vergleich der konventionellen Gelelektrophorese und der relativ neuen „Lab-on-a-chip“-Technologie am Beispiel des Experion Automated Electrophoresis Systems (Biorad) angestellt. Es wurde untersucht, ob sich die beiden Methoden zum Nachweis von PCR-Produkten hinsichtlich der Nachweisgrenze voneinander unterscheiden.

Aufgrund widersprüchlicher Literaturangaben bezüglich der phänotypischen Eigenschaften einiger psychrophiler und psychrotoleranter Clostridien, wurden Clostridien-Referenzstämme sowie das Isolat eines *C. estertheticum*-like Organismus (Ziegler, 2009), kultiviert, beschrieben und mit den Ergebnissen anderer Autoren verglichen.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Rindfleischerzeugung in Deutschland

2.1.1 Haltungsformen und Marktbedeutung

Deutschland zählt innerhalb der Europäischen Union (EU), neben Frankreich und Spanien, zu den wichtigsten Fleischproduzenten (DBV, 2014). Dabei hat für die deutschen Landwirte die Haltung von Milchkühen und Fleischrindern eine große Bedeutung (Brömmer, 2005). Die Rindfleischproduktion in Deutschland ist durch die Milchviehhaltung geprägt (Deblitz et al., 2007), etwa die Hälfte des in Deutschland produzierten Rindfleischs stammt aus der intensiven Stallmast von männlichen Nachkommen aus der Milchkuhhaltung (Brade, 2007). Die Bullenmast gilt dabei als Standardverfahren der Rindermast und ist weit verbreitet, die Tiere werden bis zu einem Gewicht von 600-650 kg gemästet (Wiedenmann et al., 1999). Weitere 30 % der Rindfleischproduktion in Deutschland stellen Altkühe dar (Pflaum et al., 1992). Die Rinderhaltung zur ausschließlichen Rindfleischerzeugung findet oft als Mutterkuhhaltung spezieller Fleischrinderrassen statt (Brade, 2007), wobei die Anzahl an Mutter- und Ammenkühen in Deutschland jedoch nur etwa 5 % des Gesamtrinderbestandes ausmacht (Brömmer, 2005).

Seit 1990 kommt es in Deutschland zu einem mit wenigen Ausnahmen anhaltendem Rückgang des Gesamtrinderbestandes (Abbildung 1). Wurden im Dezember 1990 bei der ersten Gesamtdeutschen Viehzählung noch 19,5 Millionen Rinder gezählt, so ergab die Rinderzählung im Mai 2014 eine Zahl von 12,7 Millionen Tieren (Statistischen Bundesamt, 2014a).

Die Anzahl der Betriebe mit Rinderhaltung in Deutschland nimmt ebenfalls kontinuierlich ab: Wurden im November 2010 noch 175.000 Rinderhaltungen gezählt, waren es im Mai 2014 nur noch rund 155.000 Rinderhaltungen (Statistisches Bundesamt, 2014a).

Bei den Milchkuhhaltungen in Deutschland wurden überwiegend kleinere Betriebe aufgegeben, wohingegen der Bestand der größeren Milchkuhhaltungen ausgebaut wurde (Statistisches Bundesamt, 2012). Der Bestand an Milchkühen lag im November 2013 bei 4,3 Millionen Tieren und stieg damit erstmals seit 2005 wieder auf diesen Wert an (Statistischen Bundesamt, 2014a).

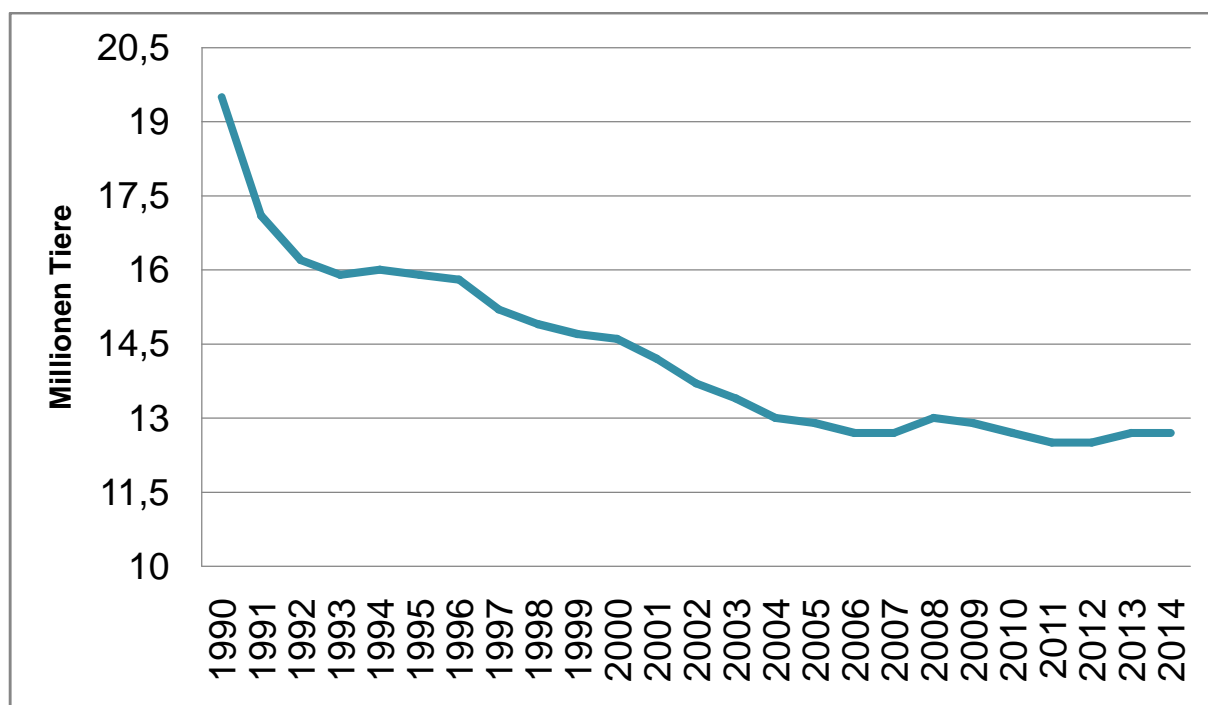


Abbildung 1: Gesamtrinderbestand in Deutschland in Millionen Tiere, von 1990 bis 2014 (Statistisches Bundesamt, 2014a)

Die Rindfleischproduktion in Deutschland belief sich im Jahr 2011 auf 1,2 Millionen Tonnen Rindfleisch, 2012 und 2013 wurden nur noch 1,1 Millionen Tonnen gewerblich erzeugt (Statistisches Bundesamt, 2013 und 2014b).

Der Verzehr der deutschen Bevölkerung an Rind- und Kalbfleisch liegt an dritter Stelle nach dem Verzehr von Schweine- und Geflügelfleisch. Abbildung 2 zeigt den Fleischverzehr je Kopf der Bevölkerung in Deutschland für das Jahr 2013, aufgeteilt nach Tierarten. Der Durchschnittsverzehr von Rind- und Kalbfleisch liegt in Deutschland seit mehr als zehn Jahren hinter dem von Geflügelfleisch. Gründe hierfür sind die gewachsene Angebotsvielfalt im Geflügelsektor sowie das Preisgefälle zwischen Rind- und Geflügelfleisch (Deutscher Fleischer – Verband, 2012/2013). Zudem kam es nach 2001 in Folge der BSE-Krise (Bovine Spongiforme Enzephalopathie) in Deutschland zu einem spürbaren Einbruch des Rindfleischkonsums. Danach stieg die Verzehrsmenge nicht mehr auf das Niveau vor der Krise an (BVDF, 2012). Die durchschnittliche Verzehrsmenge der einzelnen Fleischarten ist jedoch laut dem Deutschen Fleischerverband in den letzten Jahren relativ stabil geblieben.

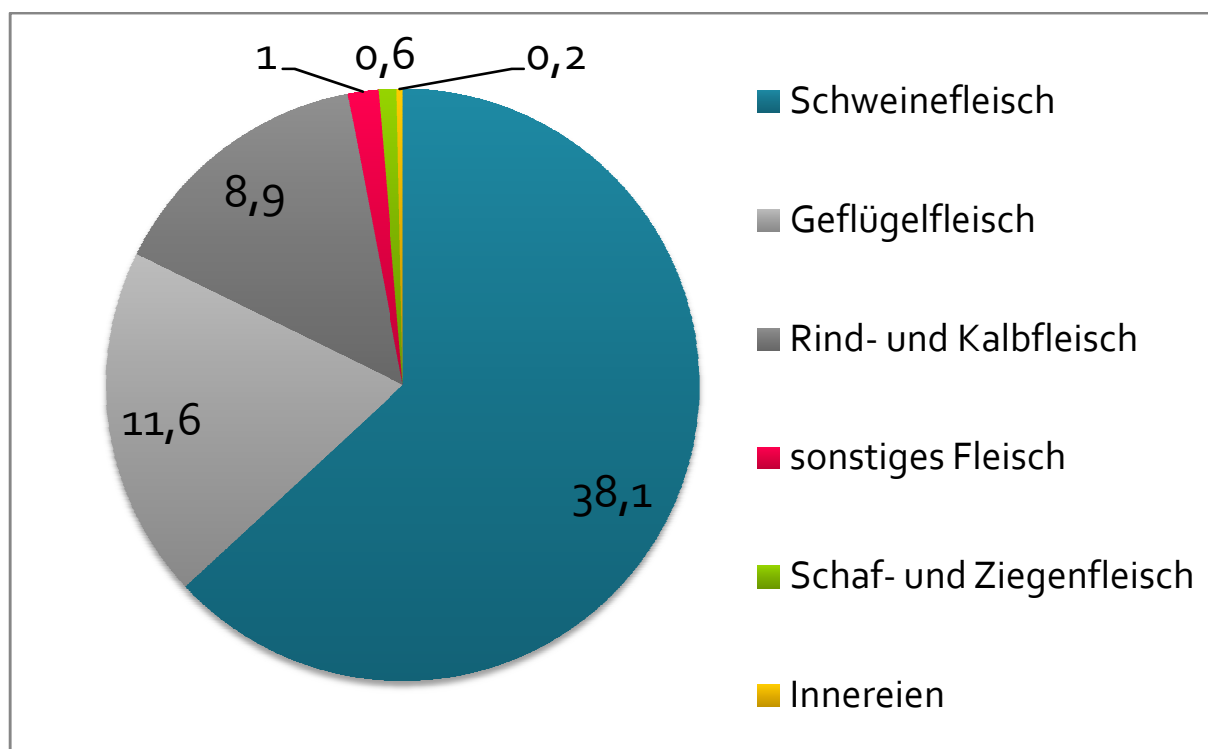


Abbildung 2: Fleischverzehr je Kopf der Bevölkerung in Deutschland für das Jahr 2013 in Kilogramm, aufgeteilt nach Tierarten (BVDF, 2014)

2.1.2 Strukturwandel der fleischverarbeitenden Betriebe

In den vergangenen Jahren hat sich ein Strukturwandel innerhalb der Versorgungsketten der Fleischwirtschaft vollzogen (Recke et al., 2011). Die klassische Ordnung der Schlachtbranche in Deutschland setzte sich aus wenigen größeren Unternehmen sowie einer Vielzahl kleiner und mittlerer Unternehmen zusammen (Theuvsen und Recke, 2008). Am deutschen Fleischmarkt und bei den Schlachthöfen in Deutschland findet inzwischen ein fortschreitender Konzentrationsprozess statt (Burchardi et al., 2007; Hortmann-Scholten, 2011). Dieser Konzentrationsprozess ist laut Maak et al. (2006) in den letzten Jahren sehr schnell voran geschritten und betrifft auch die deutsche Rinderschlachtung und –zerlegung. So wurden drei große deutsche Rinderschlacht- und Zerlegebetriebe, die Firmen Moxsel, Norddeutsche Fleischzentrale und Südfleisch durch den VION-Konzern übernommen. Im Gegensatz dazu sind bei den kommunalen Schlachthöfen fortschreitende Stilllegungen zu erwarten, da dort die Produktionskosten in der Regel höher sind als in anderen Betriebsstätten (Burchardi et al., 2007).

Durch den fortschreitenden Zusammenschluss der Schlachtunternehmen und der Tatsache, dass deren wichtigste Partner, nämlich Viehhändler und Landwirte, selbst

wesentlich weniger stark konzentriert sind, haben diese inzwischen eine schwache Verhandlungsposition inne (Recke et al., 2011). Laut Burchardi et al. (2007) wird sich die Anzahl der Vermarktungspartner in der Wertschöpfungskette weiter verringern. In Deutschland werden mittlerweile etwa 75 % des Fleisches über den filialisierten Lebensmitteleinzelhandel abgesetzt (Spiller et al., 2005). Dadurch kommt es zu einem hohen Preisdruck auf die Schlacht- und Verarbeitungsbetriebe (Recke et al., 2011). Dieser wird zusätzlich durch den weiter steigenden Stellenwert des Discountbereichs und dem damit verbundenen Wachstum im Bereich des SB-Fleisches, das durch niedrigere Handelsspannen gekennzeichnet ist, verschärft (Recke et al., 2011). Die Fleischbranche reagiert auf die Globalisierung der Fleischmärkte durch eine weltweite Konzentration bei den Schlachtunternehmen sowie der Entstehung großer Fleischzentren mit angeschlossener Zerlegung und Verarbeitung (Windhorst, 2008). Daneben zeichnet sich eine zunehmende Entwicklung der großen Fleischkonzerne von reinen Schlachtbetrieben zu Anbietern von verpackten Selbstbedienungs- (SB-Ware) und Convenienceprodukten ab (Köhne, 1996; Maak et al., 2006). Dieser Sektor der Fleischbranche gewinnt laut Maak et al. (2006) immer mehr an Bedeutung und hat neben dem Veredelungssektor, also der Weiterverarbeitung des Fleisches innerhalb des Unternehmens, das größte Wachstumspotenzial. Laut Theuvsen und Recke (2008) ist die Konzentration der deutschen Schlachtbranche im internationalen Vergleich noch recht niedrig. So sind etwa in Dänemark von den 77 in den 60er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts vorhandenen Schlachtbetrieben nur zwei Stück übrig geblieben (Theuvsen und Recke, 2008).

Windhorst (2008) stellt die Prognose, dass sich der Konzentrationsprozess in der fleischverarbeitenden Industrie und im Lebensmitteleinzelhandel auch im kommenden Jahrzehnt weiter fortsetzt.

2.1.3 Technologie der Schlachtung und Zerlegung des Rindes

Unter Schlachtung versteht man die Tötung von Tieren durch Blutentzug (Lienhop, 1974; Moiser, 1966). Laut Kapitel I Art. 2 (j) der Verordnung (EG) Nr. 1099/2009 ist die Schlachtung definiert als die Tötung von Tieren zum Zweck des menschlichen Verzehrs.

Die Schlachtung des Rindes umfasst dabei mehrere Schritte (Keim, 1999; Latz et al., 2003; Lienhop, 1974; Moiser, 1966; Prändl et al., 1988).

Vor dem Blutentzug muss das Tier betäubt werden (§§ 4, 4a, TierSchG; Art. 4 Verordnung (EG) Nr. 1099/2009). Beim Rind ist die Betäubung mittels Bolzenschussapparat die gebräuchlichste Form.

Nach der Betäubung des Schlachtrindes folgt das Entbluten. Das Rind wird zum Entbluten entweder an den Hinterbeinen aufgehängt oder die Entblutung erfolgt liegend. Zum Blutentziehen wendet man beim Rind hauptsächlich den Bruststich an, jedoch ist der Halsschnitt ebenfalls möglich.

Es folgt das Absetzen von Kopf und Unterfüßen sowie die Enthäutung des Schlachtkörpers. Diese kann entweder per Hand oder maschinell erfolgen, es dürfen jedoch weder Haut noch Fleisch verletzt werden. Die Haut wird von der Stichstelle aus in einem geradlinigen Längsschnitt (Mittelschnitt) bis zum After sowie in die andere Richtung bis zum Maul aufgeschnitten. Von den Gliedmaßen ausgehend erfolgen die vier Beinschlitzte von den Klauenrändern über die äußeren Sprunggelenke, so dass sie den Mittelschnitt rechtwinklig treffen.

Anschließend folgt die Eviszeration. Der Magen-Darm-Trakt ist direkt nach dem Enthäuten zu entnehmen, damit keine Keime daraus in die Körperhöhlen gelangen. Nachdem der After kreisförmig umschnitten und mit einer Plastiktüte umhüllt wurde, erfolgt der Bauchschnitt bis zum Brustbein. Anschließend werden die Becken- und Baueingeweide mit Ausnahme der Nieren, die im Tierkörper verbleiben, entnommen. Die Speiseröhre muss vor dem Durchtrennen magenseitig zweifach abgebunden werden, damit kein Magen- und Speiseröhreninhalt entweicht.

Anschließend wird das Brustbein komplett gespalten, um die Brusteingeweide, das sogenannte Geschlinge, bestehend aus Lunge, Herz, Luft- und Speiseröhre sowie der anhaftenden Leber entnehmen zu können.

Die anschließende Teilung des Tierkörpers in zwei Hälften kann mittels Spalter, handgeführten Spaltsägen oder automatischen Spaltvorrichtungen erfolgen (Keim, 1999; Latz et al., 2003; Lienhop, 1974; Moiser, 1966; Prändl et al., 1988).

Abbildung 3 zeigt den Ablauf der Rinderschlachtung im sogenannten Schlachtstraßensystem.

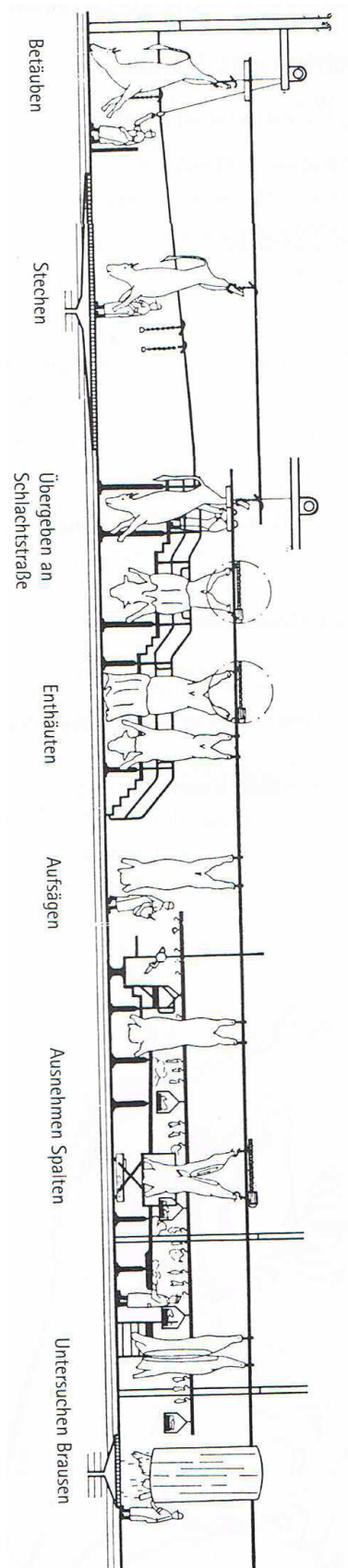
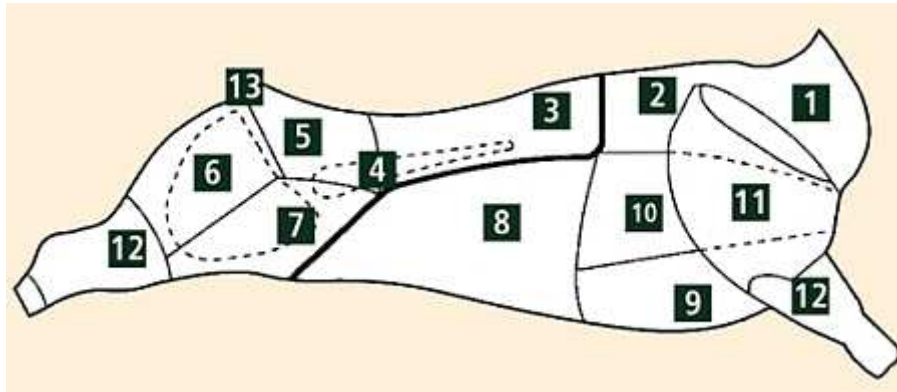


Abbildung 3: Ablauf der Rinderschlachtung im Schlachtstraßensystem (Keim, 1999)

Die Nomenklatur der einzelnen Fleischteile ist in Deutschland nicht einheitlich. Für die vorliegende Arbeit wurden die Bezeichnungen nach Scheper und Scholz (1985) verwendet, die in Abbildung 4 mit der Schnitfführung der Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e.V. (DLG) für die Zerlegung des Schlachtkörpers vom Rind dargestellt sind. Nach der Schlachtung erfolgt zunächst die Grobzerlegung der Rinderhälften in Vorder- und Hinterviertel. Die Trennung findet zumeist zwischen der 8. und 9. Rippe statt, die Schnitfführung kann jedoch variieren. Das Vorderviertel wird grob zerlegt in Bug mit Hesse, Hals, Brust und Spannrippen. Das Hinterviertel wird zunächst in Dünnung, Roast Beef mit Filet und Keule zerlegt. Die Keule setzt sich aus Ober- und Unterschale, Hüfte und Kugel zusammen. Nach der Grobzerlegung erfolgt das Ausbeinen und Zerlegen der Teilstücke (Latz et al., 2003; Scheper und Scholz, 1985).



Nummer	Teilstück
1	Hals/Kamm/Nacken
2	Fehlrippe/Hohe Rippe
3	Roast Beef/Rücken
4	Filet
5	Hüfte/Blume
6	Unter- und Oberschale
7	Nuss/Kugel
8	Knochen- und Fleischeddierung
9	Brust
10	Spannrippe/Querrippe
11	Bug/Schulter
12	Vorder-/ Hinterhese
13	Schwanzstück

Abbildung 4: Einteilung der Rinderhälfte in die verschiedenen Teilstücke nach der DLG - Schnitfführung (Scheper und Scholz, 1985)

2.1.4 Hygiene und kritische Kontrollpunkte bei der Rinderschlachtung und -zerlegung

Der Schlachthof muss laut Abschnitt I Kap. II Anhang III der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 so konzipiert sein, dass das Fleisch keinen Kontakt zum Boden, den Wänden oder der Einrichtung hat. Die Schlachtlinien müssen einen kontinuierlich ablaufenden Schlachtprozess und eine Vermeidung von Kreuzkontaminationen zwischen den verschiedenen Arbeitsbereichen gewährleisten.

Es muss eine räumliche oder zeitliche Trennung herrschen von:

- Betäubung und Entbluten
- Ausnehmen und weiteres Zurichten
- Bearbeiten von gereinigten Mägen und Därmen

- Bearbeiten und Waschen anderer Nebenprodukte der Schlachtung
- Umhüllen von Nebenprodukten der Schlachtung
- Versand von Fleisch

(Abschnitt I Kap. II Anhang III der Verordnung (EG) Nr. 853/2004).

Laut Smulders (2007) ist die Schlacht tieruntersuchung von entscheidender Bedeutung, um die Hygiene des gesamten Schlachtprozesses positiv zu beeinflussen. So wird das Absondern von Tieren möglich, die krank sind oder krank erscheinen und eine Kontamination der Schlachtlinie mit pathogenen Keimen kann vermieden werden.

Die Kontamination von Fleisch mit unerwünschten Mikroorganismen erfolgt vorrangig beim Schlachten der Tiere (Weindlmaier et al., 2008). Hygienische Schwerpunkte bei der Rinderschlachtung und -zerlegung sind laut Beutling (1992a) Betäubung, Entbluten, Fellabzug, Evisceration sowie das Spalten des Tierkörpers mit der Entfernung des Rückenmarks.

Wenn die Betäubung nur unzureichend ausgeführt wird, kann kein gezielter Bruststich erfolgen. Das Entbluten der Tiere wird demzufolge beeinträchtigt und es verbleiben größere Restblutmengen im Fleisch (Beutling, 1992a).

Beim Durchstechen der Haut mit dem Messer beim Fellabzug besteht die Gefahr, dass am Fell anhaftende Fäzes und Mikroorganismen auf den Schlachtkörper übertragen werden (Bolton et al., 2001). Die Außenseite des Fells darf beim Enthäuten nicht mit der Karkasse in Kontakt kommen, Arbeitskräfte und –geräte, die mit dem Fell in Berührung kommen, dürfen keinesfalls das Fleisch berühren (Anh. III, Abschn. I, Kap. IV, Abs. 7 (b) Verordnung (EG) Nr. 853/2004).

Bei der Evisceration muss das Austreten von Darm- und Panseninhalt verhindert werden, damit es zu keiner Verunreinigung des Schlachtkörpers kommt (Anh. III, Abschn. I, Kap. IV, Abs. 7 (c) Verordnung (EG) Nr. 853/2004). An dieser Stelle ist das Abbinden des Schlunds mit einem Gummiring (Rodding) und des Mastdarms mit einer Plastiktüte und einem Gummiring von entscheidender Bedeutung (Bolton et al., 2001).

Wie wichtig eine umfassende Hygiene bei der Rinderschlachtung ist, wird im Hinblick auf die Ergebnisse bisheriger Studien zu der Verteilung psychrotoleranter Clostridien in Schlachthöfen deutlich. Bei den Untersuchungen der Schlachthofumgebung von Moschonas et al. (2011b) stellten Clostridien die größte isolierte Gruppe unter den psychrophilen Anaerobiern dar. Broda et al. (2009) kamen zu dem Schluss, dass die Kontamination der Karkassen mit psychrophilen Clostridien vor allem während der ersten Schnitte beim Zurichten erfolgt. Felle und Fäzes der Schlachttiere erwiesen sich als Hauptkontaminationsquellen (Boerema et al., 2003; Broda et al., 2009; Moschonas et al., 2009; Moschonas et al., 2011b).

Auch das Personal stellt bei mangelnder Hygiene eine ernsthafte Kontaminationsquelle für das Fleisch dar. Menschen, die im Lebensmittelbereich arbeiten müssen ein hohes Maß an persönlicher Sauberkeit halten sowie saubere Arbeits- und gegebenenfalls Schutzkleidung tragen. Außerdem ist Personen, die an einer Krankheit leiden, die durch Lebensmittel übertragen werden kann, oder Personen mit infizierten Wunden, Hautinfektionen oder Diarrhoe der Umgang mit Lebensmitteln und das Betreten von Bereichen, in denen mit Lebensmitteln umgegangen wird, generell verboten. Betroffenen Personen müssen außerdem die Krankheit einschließlich der Symptome schnellstmöglich dem Lebensmittelunternehmer melden (Kap. VIII Anhang II der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 und § 42 Infektionsschutzgesetz).

2.1.5 Reinigung und Desinfektion in fleischverarbeitenden Betrieben

C. estertheticum ist vermutlich der häufigste Verursacher von Blown Pack Spoilage bei vakuumverpacktem Rindfleisch (Cavill et al., 2011). Vertreter der Gattung *Clostridium* sind in der Lage, hitzestabile Endosporen zu bilden (Schaumann und Rodloff, 2009). Diese Endosporen können mit den gewöhnlichen Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen meist nicht unschädlich gemacht werden, da sie eine hohe Tenazität aufweisen (Brown, 2000; Setlow und Johnson, 2007). Böhm (2013) untersuchte die Wirkung von verschiedenen Desinfektionsmitteln gegen *C. estertheticum* auf verschiedenen Oberflächen unter Laborbedingungen. Die Wirksamkeit dieser Desinfektionsmittel in mit psychrophilen Clostridien kontaminierten Betrieben wurde bisher noch nicht überprüft.

Bei der Herstellung von Lebensmitteln muss ein ausgewogenes Verhältnis zwischen dem Reinigungsmanagement des jeweiligen Betriebes und anderen Hygienemaßnahmen wie etwa der Personalhygiene oder einer hygienischen Arbeitsweise bestehen (North, 1995). Laut De Loos (1995) können ideale Hygienestandards in Lebensmittelbetrieben nur erreicht werden, indem während der Produktion systematisch und hygienisch gearbeitet wird und nach der Produktion eine effektive Reinigung und Desinfektion der Betriebsräume, -anlagen und -geräte erfolgt.

Schmutzansammlungen sollten bereits während des Produktionsprozesses vermieden werden (Smulders, 2007). Täglich nach Schichtschluss sollte eine gründliche Reinigung und Desinfektion durchgeführt werden, so dass die Produktionsanlagen wieder in einem hygienisch einwandfreien Zustand sind (Beutling, 1992b). Daneben werden laut Beutling (1992b) in fleischverarbeitenden Betrieben am Ende der Arbeitswoche oft zusätzliche Reinigungsaktionen durchgeführt, damit zeitlich und organisatorisch aufwendigen sowie arbeitsintensiven Generalsanierungen des Betriebes, die ein Einstellen des Produktionsprozesses erfordern, entgangen werden kann.

Das Deutsche Institut für Normung e. V. (DIN) gibt in der DIN 10516 (2009) „Lebensmittelhygiene – Reinigung und Desinfektion“ eine Anweisung für eine korrekte und erfolgreiche Reinigung und Desinfektion in Lebensmittelbetrieben. Reinigung und Desinfektion müssen als zwei getrennte Vorgänge gesehen werden. Dabei soll die in fleischverarbeitenden Betrieben üblicherweise auftretende hohe Anzahl an Mikroorganismen auf ein möglichst niedriges Level herabgesetzt werden (Reuter, 1994). Vor der Desinfektion ist eine gründliche Reinigung notwendig, damit ein Desinfektionsmittel in direktem Kontakt mit den Mikroorganismen seine mikrobiozide Wirkung entfalten kann, denn Mikroorganismen können im Schmutz eingeschlossen sein (Bessems, 2003; Heinrich et al., 1974). In diesem Biofilm können Bakterien überleben, von denen eine Kontaminationsgefahr für das hergestellte Lebensmittel ausgeht, wenn sich Teile des Biofilms vom Untergrund ablösen (Beutling, 1992b; Genigeorgis, 1995; Jessen et al., 2003).

Die Auswahl eines passenden Reinigungsmittels für einen fleischverarbeitenden Betrieb erfolgt nach verschiedenen Kriterien: das Reinigungsmittel sollte ein gutes Fettlöse- und Schmutztragevermögen besitzen, es sollte leicht zu handhaben sein

und schon in geringer Konzentration eine hohe Wirksamkeit aufweisen. Außerdem darf die Gebrauchslösung nicht toxisch oder reizend sein (Beutling, 1992b).

Anfallende Verunreinigungen in der Fleischwirtschaft bestehen laut Schmidt und Leistner (1981) vor allem aus Fett- und Eiweißresten, weshalb hier hauptsächlich alkalische Reinigungsmittel verwendet werden. Durch Laugen quellen Eiweißrückstände auf und können so von der Oberfläche abgelöst werden (Schmidt und Leistner, 1981). Der Einsatz eines Reinigers allein reicht jedoch meist nicht aus, denn Salz- und Kalkrückstände sowie Eisenablagerungen an den Gerätschaften müssen mit einem sauren Reiniger entfernt werden, da diese Ablagerungen durch Säuren in ihre lösliche Form gebracht werden (Reuter, 1994; Schmidt und Leistner, 1981; Smulders, 2007). Als hilfreich erweist sich zudem die Anwendung eines neutralen Reinigungsmittels, denn diese Tenside lagern sich an Grenzflächen ab und senken die Grenzflächenspannung. Dadurch kann die Reinigungslösung besser eindringen, Schmutz wird besser erreicht und von den Oberflächen verdrängt (Schmidt und Leistner, 1981). In Tabelle 1 sind die verschiedenen Reinigungssubstanzen und ihre Anwendungsbereiche nach Reuter (1994) zusammengefasst.

Tabelle 1: Einteilung der Reinigungssubstanzen und ihre Anwendungsgebiete nach Reuter (1994)

Gruppe	Anwendungsgebiet
Stark alkalische Reiniger	Massive Eiweiß- und Fettverschmutzungen, Kochkessel oder Blutrinne und Räucherammer
Mäßig alkalische Reiniger	Zur Entfernung von Eiweiß und Fett sowie zur allgemeinen Betriebsreinigung und Sattenwäsche
Neutrale Reiniger	Zur Entfettung und für manuelle Reinigung
Saure Reiniger	Für Salz- und Härtebeläge
Alkalisch-chlorhaltige Produkte	Für Maschinen, Wände, Tische, Decken, Böden und Lkw-Innenreinigung

Nach der Reinigung muss das Reinigungsmittel mit Trinkwasser abgespült werden, wodurch der gelöste Schmutz und ein Großteil der Mikroorganismen beseitigt werden (Reuter, 1994). Eine gründliche Reinigung ist die Voraussetzung für eine wirksame Desinfektion, damit wässrige Desinfektionsmittel als geschlossener Flüssigkeitsfilm auf den Oberflächen haften können (Beutling, 1992b; DIN 10516, 2009).

Durch die Desinfektion soll die Anzahl der lebenden pathogenen und apathogenen Keime im lebensmittelverarbeitenden Betrieb verringert werden (Beutling, 1992b; Smulders, 2007). Die Desinfektion kann physikalisch oder chemisch erfolgen (Block, 2001). Physikalische Desinfektionsverfahren sind beispielsweise die thermische Einwirkung mittels Heißluft, Ultraviolett- oder Infrarotbestrahlung und sind besonders für Produktionsbereiche oder –geräte geeignet, die schwer zugänglich sind oder eine verwinkelte Oberfläche aufweisen (Beutling, 1992b; DIN 10516, 2009; Heinrich et al., 1974). Bei der chemischen Desinfektion ist die Auswahl eines geeigneten Desinfektionsmittels von entscheidender Bedeutung. In den Desinfektionsmittellisten der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) sind alle für den Lebensmittelbereich geeigneten Desinfektionsmittel verzeichnet. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über verschiedene Wirkstoffgruppen, die im Lebensmittelbereich zur chemischen Desinfektion eingesetzt werden.

Tabelle 2: Übersicht über im Lebensmittelbereich zur chemischen Desinfektion eingesetzte Wirkstoffgruppen (Bessems, 2003; Brunner et al., 2000; DIN 10516, 2009; Reuter, 1994; Schliesser, 1981)

Wirkstoff	Vorteile	Nachteile
Peressigsäure	Breites Wirkspektrum, sporozid Schnell wirksam Keine Rückstandsbildung Sensorische Unbedenklichkeit Kein Kältefehler Geringer Eiweißfehler	Korrosion Stark ätzend Ggf. Explosionsgefahr
Aktivchlor-Präparate	Breites Wirkspektrum Schnell wirksam	Eiweiß- und Kältefehler Problemkeime: grampositive Bakterien und Hefen
Quaternäre Ammoniumverbindungen	Sensorische Unbedenklichkeit Gute Handhabung Leicht wasserlöslich Materialverträglichkeit (ausgenommen Eisen)	Eiweiß- und Kältefehler Nicht sporozid Problemkeime: Pseudomonaden und andere gramnegative Bakterien
Amphotensid-Präparate	Sehr geringe Toxizität Nicht korrosiv Gewebsfreundlich Kombinierter Reinigungs- und Desinfektionseffekt	Mäßiger Eiweißfehler Deutlicher Kältefehler

Fortsetzung Tabelle 2

Wirkstoff	Vorteile	Nachteile
Organische Säuren	Rückstandsfreiheit Gute Umweltverträglichkeit	Eiweiß- und Kältefehler Korrosiv Haut- und Schleimhautreizend Mangelnde Kurzzeitwirkung
Alkohole	Breites Wirkspektrum Rasche Verdunstung auf Oberflächen Einsatz als Schnelldesinfektionsmittel	Eiweißfehler Nicht sporozid Brand- und Explosionsgefahr

Grundsätzlich ist nach De Loos (1995) darauf zu achten, dass der aktive Bestandteil des Desinfektionsmittels in der Lage ist, alle während des Produktionsprozesses auftretenden Mikroorganismen abzutöten. Das Desinfektionsmittel muss eine geringe Toxizität für den Menschen aufweisen, leicht abzuspülen sein und darf weder den Geruch noch den Geschmack des Lebensmittels negativ beeinflussen (Beutling, 1992b; Reuter, 1994). Zusätzlich sollte es bereits nach kurzer Zeit eine effektive mikrobiozide Wirkung entfalten und darf keine oder möglichst wenig unerwünschte Nebenwirkungen, wie etwa die Schädigung der Ausrüstung durch Korrosion haben (De Loos, 1995; Reuter, 1994). Außerdem sollte das Desinfektionsmittel anwenderfreundlich sein, da es ansonsten meist nicht nachhaltig benutzt wird (De Loos, 1995). Hinsichtlich der Wirksamkeit des Desinfektionsmittels muss das Auftreten einer verminderten Wirkung durch Interaktion mit speziellen inaktivierenden Faktoren beachtet werden. Dabei ist auf das Auftreten des sogenannten Kältefehlers zu achten, das heißt ein Wirksamkeitsverlust des Desinfektionsmittels bei veränderter Umgebungstemperatur. Dagegen handelt es sich beim Eiweißfehler um einen Wirksamkeitsverlust bei Vorliegen von Restschmutz. Beide Faktoren sind für den Lebensmittelbereich entscheidend, da dort viele Arbeitsvorgänge im Kühlbereich ablaufen und in bestimmten Bereichen keine vollständige Reinigung erzielt werden kann (Reuter, 1994).

Darüber hinaus ist bei der Durchführung der Desinfektion von entscheidender Bedeutung, dass das Desinfektionsmittel in der richtigen Konzentration angewendet wird und dass die korrekte Einwirkzeit beachtet wird (Heinrich et al., 1974). Laut DIN 10516 (2009) können nach Erfahrungswerten aus der Fleischindustrie Resistenzen auftreten.

Nach erfolgter Reinigung und Desinfektion müssen Reste von Reinigungs- und Desinfektionsmittel mit einem geeigneten Verfahren entfernt werden, zum Beispiel durch Abspülen mit Trinkwasser und die behandelten Oberflächen sollten trocknen können (DIN 10516, 2009; Smulders, 2007).

Die Effizienz der Reinigung und Desinfektion sollte nach Beutling (1992b) durch eine bakteriologische Untersuchung überprüft werden. Im positiven Fall werden bei der Untersuchung niedrige Keimzahlen und keine pathogenen Keime nachgewiesen. Ansonsten sollten die Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen wiederholt werden. Von entscheidender Bedeutung für den Erfolg von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen sind nach De Loos (1995) die Sorgfalt und Motivation des Personals in der Produktionslinie eines Lebensmittelbetriebes.

2.2 Verderb von Rindfleisch

2.2.1 Allgemeine aerobe und anaerobe Verderbsmikrobiota auf Rindfleisch

Bei der Kühlagerung von Fleisch dominieren unter aeroben Bedingungen vor allem *Pseudomonas* spp., wie *Pseudomonas fluorescens* und *P. fragi*, die meist mit Kokken aus der Acinetobacter-Moraxella-Gruppe vergesellschaftet sind (Krämer, 2007). Durch das Vakuumieren von Fleisch werden aerobe Mikroorganismen in ihrem Wachstum gehemmt. Das Fleisch wird somit vor den schädlichen Einflüssen dieser Bakterien geschützt und die Haltbarkeit des Produktes verlängert (Gill, 2003). Im Laufe der Lagerung von vakuumverpacktem Fleisch findet eine Verschiebung der mikrobiellen Population statt. Auch aerobe Bakterien können auf vakuumverpacktem Fleisch einige Zeit überleben, da nach der Vakuumierung Restluftanteile vorhanden sind (Müller G. und Müller C., 1996). Laut Holzapfel (2003) wird dieser Restsauerstoff allmählich durch das Fleischgewebe und die vorhandenen Mikroorganismen veratmet. Dabei entsteht Kohlendioxid (CO₂), das Milieu in der Vakuumverpackung wird annähernd anaerob und die Mikroorganismenpopulation verschiebt sich zugunsten anaerober Bakterien.

Psychrotrophe Milchsäurebakterien gelten dabei als dominierende Keime auf vakuumverpacktem Rindfleisch (Borch et al., 1996; Hernández-Macedo et al., 2012; Yost et al., 2002). Typische Vertreter sind *Carnobacterium* spp., *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc carnosum* und *Leuconostoc gelidum* (Hernández-Macedo et al., 2011). Diese Mikroorganismen verstoffwechseln die auf

dem Fleisch vorhandene Glukose zu Milchsäure, wodurch der pH-Wert des Produktes sinkt (Yang et al., 2009b; Yang et al., 2011).

Die Lagerungstemperatur und der pH-Wert des Fleisches sind wichtige Einflussfaktoren auf die Mikrobiota. Am Ende der Haltbarkeit von vakuumverpacktem Fleisch wird die Mikrobiota im Allgemeinen von *Leuconostoc* spp. und anderen Mikroorganismen, die eine Toleranz gegenüber dem sauren Milieu besitzen, dominiert (Jones, 2004). Yang et al. (2009b) untersuchten anhand von *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* und *Carnobacterium maltaromaticum* die Entwicklung der Population von Milchsäurebakterien bei unterschiedlichen Temperaturen und wechselndem pH-Wert unter anaeroben Bedingungen. Dabei zeigte *Carnobacterium maltaromaticum* bei Temperaturen unter +4 °C ein besseres Wachstum als die beiden anderen Vertreter. Jedoch wird bei pH-Werten < 5,5 das Wachstum von *Carnobacterium maltaromaticum* gehemmt. Somit kann dieses Bakterium anfangs die Verderbsmikrobiota von vakuumverpacktem Fleisch dominieren. Mit sinkendem pH-Wert des Fleisches durch die fortschreitende Fermentation der Glukose wird *Carnobacterium maltaromaticum* jedoch in seinem Wachstum gehemmt, so dass *Leuconostoc mesenteroides* und andere säuretolerante Keime die Verderbsmikrobiota dominieren.

Auch psychrotolerante Vertreter aus der Gruppe der *Enterobacteriaceae* sind Bestandteil der Mikrobiota auf vakuumverpacktem Fleisch. Laut Chaves et al. (2012) ist deren Anzahl auf frischem vakuumverpacktem Rindfleisch relativ gering, steigt nach einer gewissen Lagerungsdauer jedoch enorm an. Auch Baylis (2006) beschreibt, dass sich *Enterobacteriaceae* im Laufe der Kühlung stark vermehren können. Brightwell et al. (2007) isolierten von Verderbsfällen bei vakuumiertem Fleisch in Neuseeland *Enterobacter*, *Serratia*, *Rhanella*, *Ewingella* und *Yersinia* spp. *Enterobacteriaceae* vermehren sich in vakuumverpacktem Fleisch in der Regel nur, wenn der pH-Wert des Fleisches mehr als pH 5,8 beträgt (Gill, 2004). Außerdem begünstigen zu hohe Lagerungstemperaturen ihre Vermehrung (Brightwell et al., 2007).

Die mikrobielle Zusammensetzung bei vakuumverpacktem DFD-Fleisch wird auf Grund des höheren pH-Werts (pH 6,0 – 6,2) von *Alteromonas putrefaciens* dominiert, aber auch Milchsäurebakterien, *Enterobacteriaceae* und *Brochothrix* (*B.*) *thermosphacta* tragen zur Keimpopulation bei (Holzapfel, 2003). Fleisch stellt für *B. thermosphacta* eine ökologische Nische dar, bisher wurde dieser Keim nur auf

Fleisch bzw. in Verarbeitungsbetrieben von Fleisch gefunden (Labadie, 1999). Es handelt sich um ein fakultativ anaerobes Stäbchen, das nach McLean et al. (1953) auch bei Temperaturen zwischen 0 und +1 °C zum Wachstum fähig ist. Bisherigen Untersuchungen zufolge gehört *B. thermosphacta* nicht zur dominanten Mikrobiota auf vakuumverpacktem Fleisch (Hernández-Macedo et al., 2011; Pennacchia et al., 2011).

2.2.2 Eintragsquellen von Verderbserregern in Schlachtbetriebe

Die größte Gefahr des Eintrags von Verderbserregern in Schlachtbetriebe geht von den Schlachttieren selbst aus. Als Hauptquellen für Mikroorganismen wurden dabei Fell sowie Viscera bzw. die Fäzes der Tiere identifiziert (Boerema et al., 2003; Broda et al., 2009; McEvoy et al., 2000; Moschonas et al., 2011b).

Die Eviszeration geht heutzutage nur noch mit einer minimalen Verschmutzung der Karkassen einher, wenn der Gastrointestinaltrakt des betroffenen Tieres bei dessen Entfernung intakt bleibt (Broda et al., 2009; Grau, 1979; McEvoy et al., 2000; Nottingham et al., 1974).

Eine größere Kontaminationsgefahr geht von den Fellen der Schlachttiere aus. Im Laufe des Lebens eines Schlachttieres kommt das Fell mit einer Vielzahl an Mikroorganismen unterschiedlichster Art in Kontakt. Die Bakterien können aus dem Boden, dem Wasser, der Vegetation oder aus dem Kot der Tiere stammen und sind zum Teil während der Schlachtung noch auf dem Fell präsent (Bell, 1997; McEvoy et al., 2000). Beim Enthäutungsvorgang kann es zum Kontakt des Fells mit dem Fleisch und dadurch zu einer direkten Übertragung von Mikroorganismen auf das Fleisch kommen (Antic et al., 2010; Bell, 1997; McEvoy et al., 2000).

Auf Rinderfell befinden sich häufig pathogene Keime und Verderbserreger (Antic et al., 2010), daher hat die Schlachtierhygiene eine besondere Bedeutung für eine Reduktion des Eintrags von Verderbserregern in den Schlachtbetrieb. Einige Länder, darunter Finnland, Australien, Großbritannien und Irland, haben besondere Vorschriften und Programme entworfen, um die Kontaminationsgefahr durch die Schlachtung von Tieren mit stark verschmutztem Fell zu minimieren (McEvoy et al., 2000). Während Bell (1997) und McEvoy et al. (2000) einen klaren Zusammenhang zwischen Fellsauberkeit und Keimbelastung des Fells sehen, kamen Antic et al. (2010) zu dem Ergebnis, dass der Reinheitsgrad des Fells keinen signifikanten Einfluss auf die Zahl der gefundenen Mikroorganismen hat und dass nur ein geringer

Prozentsatz der absoluten Keimzahl des Fells bei direktem Kontakt auf das Fleisch transferiert wird. Brecheisen (2014) untersuchte, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Fellverschmutzungsgrad von Schlachtrindern und der Oberflächenkeimzahl der resultierenden Rinderschlachtkörper gibt und kam zu dem Ergebnis, dass mit ansteigenden visuellen Verschmutzungsgraden der Schlachtrinder auch die ermittelten Keimzahlen ansteigen.

Mikroorganismen können jedoch auch indirekt durch verunreinigte Hände, Kleidung oder Werkzeuge von Personen, die bei der Enthäutung arbeiten, übertragen werden (Antic et al., 2010; McEvoy et al., 2000). Nach Antic et al. (2010) weist das Fell im Bereich der Brust und distal am Bein die höchsten Keimzahlen auf. Die Autoren führen diese Ergebnisse auf den vermehrten Bodenkontakt dieser Bereiche zurück, wenn das Tier kurz vor der Schlachtung in den oft mit Fäzes verunreinigten Buchten steht oder liegt.

Beim manuellen Fellabzug ist gerade an diesen Stellen ein vermehrter Kontakt mit den Händen und dem Messer des Arbeiters gegeben, so dass ein erhöhtes Risiko der Kreuzkontamination besteht (Antic et al., 2010; McEvoy et al., 2000).

In den Untersuchungen von Bell (1997) waren die Messer deutlich weniger mit Keimen belastet als die Hände der Arbeiter. Er führte dies auf das Abspülen der Messer mit Wasser zwischen den einzelnen Karkassen und die darauf folgende Sterilisation bei +82 °C zurück. Auch McEvoy et al. (2000) schlossen aus ihren Untersuchungen, dass beim Fellabzug eine verbesserte Hygiene im Bereich der Handschuhe und Messer zu einer deutlichen Senkung der Kontaminationsgefahr der Karkassen mit Mikroorganismen aus dem Fell führt.

Eine weitere Eintragsquelle von Keimen in den Schlachtbetrieb könnte die Belüftung darstellen (Moschonas et al., 2011b). So konnten Broda et al. (2009) psychrotolerante Clostridien im Belüftungssystem von verschiedenen Schlachtbetrieben nachweisen.

Böhm (2013) wies in ihren Untersuchungen *C. estertheticum* sowohl auf Rindfleisch als auch auf Schweine- und Putenfleisch nach. Schlachthöfe könnten somit ein Kontaminationspotential mit kälteliebenden Clostridien für jegliche Fleischsorten bergen.

2.2.3 Psychrotolerante *Clostridium* spp.

2.2.3.1 Vorkommen psychrophiler und psychrotropher *Clostridium* spp.

Die Mehrzahl der bekannten *Clostridium* spp. wurde aus gemäßigten Klimazonen isoliert (Spring et al., 2003; Suetin et al., 2009). Psychrophile bzw. psychrotrophe Clostridien wurden in der Vergangenheit aus verschiedenen Quellen nachgewiesen. So etwa aus dem Boden, Matsch und Abwasser (Sinclair und Stokes, 1964), aber auch in Kartoffeln (Brocklehurst und Lund, 1982) und Milch (Bhadsavle et al., 1972).

Die Begriffe psychrophil und psychrotroph leiten sich von den griechischen Wörtern psychròs (kalt, frisch), philos (liebend, Freund) und trepho (ernähren) ab und bedeuten „kälteliebend“ bzw. „bei Kälte wachsend“. Man bezeichnet damit Mikroorganismen, die in der Lage sind, bei kalten und sehr kalten Temperaturen zu überleben und sich zu vermehren. Damit gehören sie zur Gruppe der Extremophilen: Mikroorganismen, die unter umweltbedingungen lebensfähig sind, die stark von den üblichen menschlichen oder tierischen Lebensumständen abweichen (Pikuta et al., 2007). Das Wachstumsoptimum von psychrotrophen Mikroorganismen liegt jedoch bei deutlich höheren Temperaturen als das von psychrophilen Keimen. Die Temperaturbereiche, durch die beide Begriffe voneinander abgegrenzt werden, sind in der Literatur nicht einheitlich definiert, die Übergänge sind oft fließend. De Lorenzo (2011) stellt in seiner Arbeit in Frage, ob es richtig ist, Mikroorganismen allein auf Grund einer Eigenschaft, wie etwa der Fähigkeit zum Wachstum bei Kühltemperaturen, als Extremophile zu bezeichnen. Er verweist dabei auf die Untersuchungen von Ferrer et al. (2003), die nachwiesen, dass die Übertragung von zwei Chaperon-codierender Gene des kälteliebenden Bakteriums *Oleispira antarctica* auf das mesophile Bakterium *Escherichia (E.) coli* ausreichte, um *E. coli* bei Temperaturen von +5 °C und weniger wachstumsfähig zu machen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Einteilung der Keime in psychrophil und psychrotroph gemäß den in Tabelle 3 festgesetzten Temperaturbereichen vorgenommen.

Tabelle 3: Einteilung der Mikroorganismen anhand ihres Wachstumsvermögens bei unterschiedlichen Temperaturbereichen (Adam et al., 2010; Fehlhaber und Janetschke, 1992; ICMSF, 1980)

Eigenschaft	Temperaturbereich [°C]		
	Minimum	Optimum	Maximum
psychrophil	-5 bis +5 °C	+10 bis +15 °C	+15 bis +20 °C
psychrotroph	-5 bis +5 °C	+20 bis +30 °C	+30 bis +35 °C
psychrotolerant	Wachstum unter +5 °C möglich		

Nach Broda et al. (2002) gehören zur normalen Mikrobiota des Magendarmtrakts von Tieren neben mesophilen Clostridien (Cato et al., 1986; Roberts und Mead, 1986) auch Sporen von psychrophilen Clostridien. Da sich diese Organismen bei Temperaturen über +25 °C vermehren können, scheinen diese Clostridien aus der exogenen Umwelt der Tiere zu stammen (Broda et al., 2002).

Pond et al. (2006) gelang der Nachweis von *C. gasigenes* im Darmtrakt der Regenbogenforelle, obwohl dort kein vollkommen anaerobes Milieu herrscht. Daher postulierten Broda et al. (2009), dass psychrophile Clostridien nicht nur in extremen Habitaten wie der Antarktis, sondern auch in gemäßigten Klimazonen sowie bei nicht konstant anaeroben Verhältnissen überleben können. In den letzten Jahren erlangten psychrophile und psychrotrophe Clostridien als Verderbserreger von gekühlten Lebensmitteln zunehmend an Bedeutung. Vertreter dieser Spezies wurden als Verursacher von Fällen des Verderbs bei gekühltem, vakuumverpacktem Fleisch nachgewiesen (vgl. 2.2.3.3). Die Untersuchungen von Cavill et al. (2011) lassen vermuten, dass *C. estertheticum* der häufigste Verursacher von Blown Pack Spoilage bei vakuumverpacktem Fleisch ist. Diese Arbeitsgruppe überprüfte seit 1998 zwischen 100 und 200 Proben pro Woche auf das Vorkommen von *C. estertheticum*. Dabei zeigte sich, dass verdorbenes vakuumverpacktes Fleisch mit einem pH-Wert von < 6,0, das bei einer Temperatur von +3 °C oder weniger gelagert wurde, in den meisten Fällen *C. estertheticum* enthielt.

In der Literatur findet man auch unterschiedliche Hinweise bezüglich der Bedeutung von *C. gasigenes*. Dieser Keim wurde, zusammen mit *C. estertheticum*, bereits sehr häufig aus Fell, Fäzes, in Schlachthöfen und deren Umgebung nachgewiesen (Broda et al. 2009; Moschonas et al. 2009). In den Untersuchungen von Cavill et al. (2011)

konnte *C. gasigenes* jedoch nur gelegentlich in Fleisch, Tropfsaft und der Schlachthofumgebung nachgewiesen werden.

Nach Cavill et al. (2011) ist der durch Broda et al. (2009) und Moschonas et al. (2009) beschriebene häufige Nachweis von *C. gasigenes* in Schlachthöfen durch die Anreicherung der Proben vor der Untersuchung bedingt. Durch diese Anreicherung der Proben in Pepton Yeast Glucose Starch (PYGS)-Bouillon lassen sich Keime, die ursprünglich nur in niedriger Anzahl vorhanden gewesen sind, besser nachweisen und könnten daher überinterpretiert werden. Deshalb gehen sie davon aus, dass *C. gasigenes* kein wichtiger Verursacher von Blown Pack Spoilage ist.

Dennoch konnten Silva et al. (2011) in ihren Untersuchungen von 13 vakuumverpackten Rindfleischproben mit zum Teil starker Gasbildung zeigen, dass dieses Fleisch mit *C. gasigenes* belastet war, während *C. estertheticum* an dieser Verderbsproblematik hingegen nicht beteiligt war. Auch in den Untersuchungen von Hernández-Macedo et al. (2012) wurde *C. estertheticum* in keiner der 15 untersuchten vakuumverpackten Rindfleischproben, die Blown Pack Spoilage aufwiesen, nachgewiesen.

Neben dem Nachweis von psychrophilen und psychrotoleranten Clostridien aus Proben tierischen Ursprungs, wurden diese Mikroorganismen auch aus Seesedimentproben und im Permafrostboden nachgewiesen. Mountford et al. (1997) gelang mit der Isolierung von *C. vincentii* aus dem Sediment eines Beckens des McMurdo Ice Shelf mit niedrigem Salzgehalt der Nachweis eines psychrophilen Clostridiums in der Antarktis.

Bowman et al. (2000) fanden bei ihren Untersuchungen einer Sedimentprobe des antarktischen Pendant Lake ein hohes Vorkommen an *C. estertheticum* in dieser Probe vor. Auch die Untersuchungen einer Sedimentprobe des antarktischen Süßwassersees Lake Fryxell von Brambilla et al. (2001) ergaben, dass unter den darin enthaltenen anaeroben Organismen *C. estertheticum* neben weiteren psychrotoleranten Bakterien dominierte.

Spring et al. (2003) isolierten mit *C. frigoris*, *C. lacusfryxellense*, *C. bowmanii* und *C. psychrophilum* vier neue psychrotolerante Clostridienspezies aus einer Sedimentprobe des Lake Fryxell. *C. bowmanii* wurde außerdem von Moschonas et al. (2010) im Boden außerhalb eines Schlachthofes nachgewiesen. Shcherbakova et

al. (2005) isolierten den psychophilen Keim *C. algariphilum* aus salzhaltigem Permafrostboden in Sibirien. *C. tagluense*, ein weiterer psychrotoleranter Vertreter des Genus *Clostridium* wurde 2009 von Suetin et al. in einem Bohrkern des Permafrostbodens in der kanadischen Arktis nachgewiesen.

Cavill et al. (2011) isolierten aus vakuumverpacktem Lamm, Rind sowie einer Umweltprobe einen Keim, der sich bei der Sequenzierung des 16S rDNA Gens als phylogenetisch enger Verwandter von *C. bowmanii* und *C. tagluense* erwies. Die Verwandtschaft zu *C. tagluense* war dabei enger. Sie bezeichneten den Keim als *C. tagluense*-like. Ob es sich bei den gefundenen Isolaten tatsächlich um *C. tagluense* handelt, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

2.2.3.2 *Clostridium estertheticum* und *Clostridium estertheticum*-like Organismen

C. estertheticum gilt als der häufigste Verursacher des Blown Pack Spoilage. Collins et al. (1992) identifizierten 1989 in England das bis dato unbekannte psychrophile Bakterium von gekühltem, vakuumverpacktem Rindfleisch. Unabhängig davon isolierten Kalchayanand et al. (1993) 1989 in Amerika ebenfalls ein Bakterium von gekühltem, vakuumverpacktem Rind, das sie als *C. laramie* benannten. Spring et al. (2003) stellten in ihren Untersuchungen fest, dass beide Spezies eine enge genotypische Verwandtschaft aufweisen, weshalb sie eine Reklassifizierung der Keime in *C. estertheticum* mit den beiden Subspezies *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* (CEE) und *C. estertheticum* subsp. *laramiense* (CEL) vorschlugen.

In der Literatur existieren unterschiedliche Meinungen bezüglich der Eigenschaften und damit der Unterteilung in die beiden Subspezies. Spring et al. (2003) beschrieb bei CEL die Fähigkeit zur β -Hämolyse auf Columbia Blutagar (CBA), CEE hingegen fehlt diese Eigenschaft.

Laut Yang et al. (2010a) haben beide Subspezies die gleichen Wachstumstemperaturen und -optima, benötigen die gleichen pH-Werte zum Wachstum und haben beide die Fähigkeit zur β -Hämolyse auf CBA. Aus den Untersuchungen von Moschonas et al. (2010), bei denen Fleischproben mit Sporen von CEE und CEL beimpft wurden und die Zeit bis zur Gasbildung beobachtet wurde, geht hervor, dass das Gasbildungsvermögen von CEE deutlich größer ist, als das von CEL.

Außerdem ist nach Spring et al. (2003) CEL in der Lage, Glykogen zu verstoffwechseln, während CEE dagegen dazu nicht fähig ist. Andere Ergebnisse lieferten die Untersuchungen von Yang et al. (2009a), in denen beide Subspezies in der Lage waren, Glykogen zu verbrauchen. Tabelle 4 zeigt einen Vergleich der bisherigen Literaturangaben zu verschiedenen morphologischen Eigenschaften von CEE und CEL.

Tabelle 4: Vergleich der Untersuchungsergebnisse verschiedener Studien zu morphologischen Eigenschaften von *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* und *C. estertheticum* subsp. *laramiense*

	Autor	CEE	CEL
ß-Hämolyse auf CBA	Kalchayanand et al. (1993)	n.d.	ja
	Helps et al. (1999)	ja	n.d.
	Spring et al. (2003)	nein	ja
	Ziegler (2009)	ja	n.d.
	Yang et al. (2010a)	ja	ja
Größe der Stäbchen	Collins et al. (1992)	1x4-6 µm	n.d.
	Kalchayanand et al. (1993)	n.d.	5x10 µm
	Spring et al. (2003)	1,3-1,5x2,4-6 µm	n.d.
Sporenposition	Collins et al. (1992)	subterminal	n.d.
	Kalchayanand et al. (1993)	n.d.	terminal
	Spring et al. (2003)	v.a. subterminal, manchmal terminal oder zentral	n.d.

CEE = *Clostridium estertheticum* subsp. *estertheticum*; CEL = *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense*; n.d.= nicht durchgeführt

Der Begriff *C. estertheticum*-like Organismen wurde erstmals von Broda et al. (2002) zur Bezeichnung der Bakterienstämme K 21 und K 24 verwendet. Diese Stämme wurden zwischen 1993 und 1997 in Neuseeland von aufgeblähten, vakuumverpackten Wildfleischproben isoliert. Broda et al. (2002) wiesen durch Inokulationsversuche mit vakuumverpacktem Lammfleisch die Fähigkeit dieser Bakterienstämme nach, Blown Pack Spoilage bei einer Lagerungstemperatur von +2 °C zu verursachen. Die Analyse der 16S rDNA Gen-Sequenz von K 21 und K 24 durch Broda et al. (2000a) ergab eine gegenseitige Übereinstimmung der beiden Stämme von 99,7 %, die Übereinstimmung der Stämme mit *C. estertheticum* betrug 98,1 %.

Da sich die beiden Bakterienstämme in ihren phänotypischen und chemotaxonomischen Eigenschaften von *C. estertheticum* unterschieden, könnte es

sich nach Broda et al. (2000a) dabei um bisher unbeschriebene Clostridienspezies handeln. Auch die Analyse des Internal Transcribed Spacer (ITS)-Bereichs durch Broda et al. (2003b) von K 21, K 24 und V 1776, einem weiteren *Clostridium estertheticum*-like Stamm, der von aufgeblähten vakuumverpackten Fleisch isoliert wurde, erbrachte keine eindeutige Klärung des taxonomischen Status dieser neuseeländischen *Clostridium estertheticum*-like Stämme. In den letzten Jahren wurden laut Cavill et al. (2011) einige neue Clostridienspezies entdeckt, deren Gensequenzen nur minimale Basenabweichungen aufweisen. Hinter dem Begriff *Clostridium estertheticum*-like Organismen könnten sich aus diesem Grund eine Vielzahl unterschiedlicher psychrotoleranter Clostridienstämme verbergen.

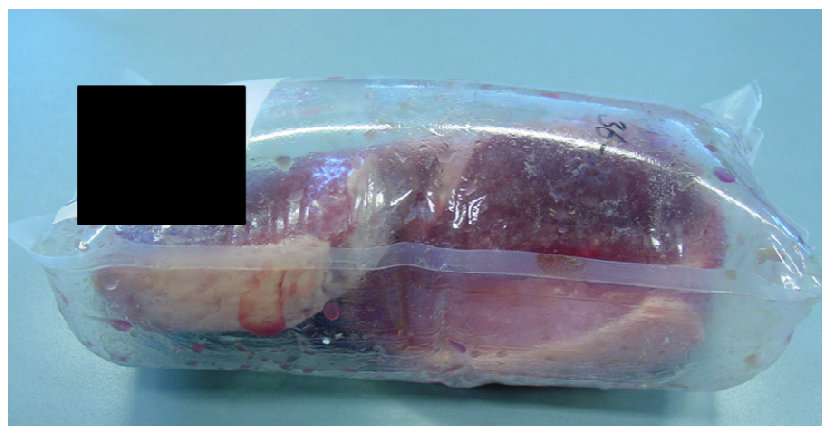
2.2.3.3 Verderb durch psychrotolerante *Clostridium* spp.

Psychrotolerante Clostridien können bei vakuumverpacktem Fleisch zu unterschiedlichen Verderbserscheinungen führen. Ende der 1980er Jahre wurde erstmals das Aufgasen von vakuumiertem Fleisch beschrieben, das weder auf zu hohe Lagerungstemperaturen noch Unterbrechungen in der Kühlkette zurückzuführen war (Dainty et al., 1989; Kalchayanand et al., 1989). Diese Form des Verderbs wird als „Blown Pack Spoilage“ bezeichnet und ist charakterisiert durch ein enormes Aufblähen der Vakuumpackungen in Verbindung mit einer übermäßigen Tropfsaftbildung. Nach dem Öffnen der Verpackung ist zudem ein fauliger, Buttersäure-artiger Geruch wahrnehmbar (Dainty et al. 1989; Kalchayanand et al. 1989).

Boerema et al. (2007) unterteilten den durch Blown Pack Spoilage verursachten Verderb je nach Ausmaß des Aufgasens der Vakuumverpackung in verschiedene Scores, den sogenannten Pack Blowing Score (vgl. Tabelle 5). Abbildung 5 zeigt eine vakuumverpackte Rindfleischprobe mit Pack Blowing Score 5.

Tabelle 5: Pack Blowing Score nach Boerema et al. (2007)

Score	Zustand der Vakuumverpackung
0	Keine sichtbaren Gasbläschen im Fleischsaft
1	Kleine Gasbläschen im Fleischsaft sichtbar
2	Vorhandene Gasmenge erweckt Anschein von Vakuumverlust
3	Verpackung offensichtlich aufgebläht, puffig
4	Vollständig aufgebläht, Folie nicht straff gespannt
5	Vollständig aufgebläht, Folie straff gespannt

**Abbildung 5:** Beispiel einer vakuumverpackten Rindfleischprobe mit Pack Blowing Score 5 (Etikett geschwärzt)

Als Verursacher dieses Verderbs wurde eine bis dahin unbekannte Spezies des Genus *Clostridium* identifiziert, *C. estertheticum*. Dieses Bakterium wurde inzwischen häufig von vakuumverpacktem Fleisch isoliert (Böhm, 2013; Broda et al., 2003b; Broda et al., 2009; Helps et al., 1999; Yang et al., 2009a; Ziegler, 2009). Bei Untersuchungen von Broda et al. (2000c), in denen Lammsteaks mit vegetativen Zellen von CEE beimpft und anschließend vakuumverpackt wurden, kam es bereits nach elf Tagen Lagerungsdauer bei +2 °C zu ersten Anzeichen von Blown Pack Spoilage. Nach einer Lagerungsdauer von 22 Tagen hatten die Vakuumpackungen das doppelte Volumen ihrer ursprünglichen Größe erreicht.

Ein weiterer bekannter Verursacher des Blown Pack Spoilage ist *C. gasigenes*, der ursprünglich von vakuumiertem Lammfleisch in Neuseeland isoliert wurde (Broda et al., 2000c). Im Gegensatz zu *C. estertheticum* produziert *C. gasigenes* weniger Gas auf vakuumverpacktem Fleisch, so dass es zu keinem vollständigen Aufblähen der

Verpackungen kommt (Broda et al., 2000c; Moschonas et al., 2010). Silva et al. (2011) wiesen *C. gasigenes* auf brasilianischem, vakuumverpacktem Rindfleisch nach. Der Keim wurde sowohl in aufgegasten Proben gefunden, als auch in solchen, die keinerlei Verderbserscheinungen zeigten. Dies unterstützt die Annahme, dass das Auftreten von Blown Pack Spoilage durch das Zusammenwirken von mehreren Organismen zustande kommt (Broda et al., 1996a).

Neben dem Anteil der psychrophilen Clostridien an der Mikrobiota des Fleisches ist die Lagerungstemperatur des vakuumverpackten Produktes entscheidend (Clemens et al., 2010; Moschonas et al., 2010). Außerdem wird das Wachstum von psychrotoleranten Clostridien durch die kompetitive Mikrobiota negativ beeinflusst, wie etwa durch Milchsäurebakterien, die Glukose zu Laktat fermentieren und dadurch den pH-Wert senken (vgl. 2.2.1). CEE und CEL benötigen für ihr Wachstum einen minimalen pH-Wert von 5,5 (Yang et al., 2009b), *C. gasigenes* einen minimalen pH-Wert von 5,4 (Broda et al., 2000c). Yang et al. (2014a) untersuchten, welchen Einfluss der pH-Wert des Fleisches bei verschiedenen psychrotoleranten Clostridien auf das Auftreten von Blown Pack Spoilage hat. *C. gasigenes* hat in diese Studie nie zur Gasbildung bei vakuumverpacktem Rindfleisch geführt. Bei mittleren pH-Werten des Rindfleisches von 5,7-5,9 führte neben *C. estertheticum* auch *C. frigoris* zu Blown Pack Spoilage, wohingegen bei Rindfleisch mit normalem pH Wert von etwa 5,5 ausschließlich *C. estertheticum* zum Aufgasen der Verpackungen führte.

Moschonas et al. (2011a, 2011b, 2012) benennen mit dem Stamm TC 1, der ursprünglich aus einer Rinderfellprobe von einem irischen Schlachthof isoliert wurde, einen weiteren Keim, der nachweislich Blown Pack Spoilage verursachen kann (Moschonas et al., 2010). Ähnlich wie bei *C. gasigenes* kommt es auch bei dem durch TC 1 verursachten Verderb nicht zu einem vollständigen Aufgasen der Vakuumverpackung. Das Gas setzt sich überwiegend aus Kohlendioxid, Wasserstoff und Butanol zusammen und ist damit typisch für den durch Clostridien verursachten Verderb (Moschonas et al., 2010). Phylogenetische Analysen des Keimes lassen vermuten, dass es sich um eine neue, bisher unbekannte Spezies des Genus *Clostridium* handelt (Moschonas et al., 2011b). TC 1 wurde inzwischen bereits in Fell, Fäzes sowie in der Schlachthofumgebung nachgewiesen, außerdem gelang der

Nachweis des Keimes aus dem Tropfsaft einer aufgeblähten Fleischprobe (Moschonas et al., 2011b).

Eine andere Form des Verderbs von vakuumverpacktem Fleisch durch psychrotolerante Clostridien ist der Oberflächenverderb. Im Unterschied zum Blown Pack Spoilage wird hier kein Gas oder nur sehr wenig Gas produziert, beim Öffnen der Vakuumverpackungen ist jedoch der Clostridien-typische Verderbsgeruch vorhanden und die Bakterien können in dem Tropfsaft oder auf der Fleischoberfläche nachgewiesen werden (Adam et al., 2010). Ein Vertreter dieser Form des Verderbs von vakuumverpacktem Fleisch ist *C. frigidicarnis* (Broda et al., 1999). Dieser Keim wurde ursprünglich von aufgeblähtem, vakuumverpacktem Rindfleisch isoliert und war in den Versuchen von Broda et al. (1999) nicht in der Lage, Blown Pack Spoilage auf vakuumverpacktem Fleisch auszulösen.

Ein weiterer mit „Bone Taint Spoilage“ bezeichneter Fleischverderb tritt im tiefen Gewebe auf. Dabei entsteht ein saurer, fauliger Geruch in der tiefen Muskulatur, dem Hüft- oder Kniegelenk oder im Knochenmark (Ingram, 1952; Ross, 1965; Gill, 1979).

In der Vergangenheit wurde diese Form des Verderbs auf das zu langsame Abkühlen der Karkassen nach der Schlachtung zurück geführt, so dass sich anaerobe Bakterien, die bereits im lebenden Schlachttier in Knochenmark, den Lymphknoten oder in der Synovia persistierten, vermehren konnten (Callow und Ingram, 1955; Moran und Smith, 1929). Bagadi und Sewell (1974) wiesen Sporen von *C. novyi* Typ B, die sie zuvor oral an Schafe verabreicht hatten, nach einem Zeitraum von zwölf Stunden in deren Mesenteriallymphknoten nach. Da diese Sporen weder im Blut noch im Gewebe der Schafe nachgewiesen werden konnten, vermuteten die Autoren eine Ausbreitung der Sporen über das Lymphsystem. Eeckhaut et al. (2012) wiesen *C. novyi* Typ B in Karkassen von klinisch gesunden Rindern nach, die nach einigen Tagen Kühllagerung bei +7 °C grünliche Verfärbungen und einen Geruch nach faulen Eiern zeigten. Die Verfärbungen waren dabei im Bereich von Hüft- und Schultergelenk am intensivsten. Da keine Verletzungen der Skelettmuskulatur sichtbar waren, gehen Eeckhaut et al. (2012) davon aus, dass Sporen des Keims mit dem Futter von den Schlachttieren aufgenommen wurden und es erst post mortem bei Kühllagerung zur Proliferation der Bakterien in den Karkassen kam. Bei den Untersuchungen von Eeckhaut et al. (2012) war es nicht möglich, *C. novyi* bei 37 °C zu kultivieren, obwohl dies die von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) vorgeschlagene Anzuchttemperatur ist.

C. putrefaciens wurde erstmals von McBryde (1911) aus gepökelttem Schinken isoliert. McBryde erhielt Reinkulturen von *C. putrefaciens*, wenn er die Proben aus dem Knochenmark entnahm. Sturges und Drake (1927) wiesen den Keim im Muskelgewebe von Schlachtschweinen nach und Cavill et al. (2011) fanden *C. putrefaciens* auf vakuumverpacktem Lamm.

Broda et al. (1996b) berichtet von Bone Taint Spoilage durch psychrotrophe *Clostridium* spp. bei gekühlten, vakuumverpackten Lammbeinen in Neuseeland, die keiner Temperaturschwankung ausgesetzt waren. Das Fleisch erschien dabei optisch einwandfrei, eröffnete man jedoch das Kniegelenk durch einen Schnitt, wurde ein unangenehmer, käsig-milchiger Geruch freigesetzt. Dabei war es nicht möglich, psychrotrophe Clostridien aus dem Tropfsaft der Lammbeine zu isolieren. Daher gingen Broda et al. (1996b) davon aus, dass die Kontamination mit den Keimen bereits vor der Schlachtung stattgefunden haben musste und nicht durch Oberflächenverschmutzung während des Schlachtprozesses zustande kam.

Bekannte Verursacher von Bone Taint Spoilage sind *C. algidicarnis* sowie *C. putrefaciens*, die eng miteinander verwandt sind (Broda et al., 2000a). *C. algidicarnis* wurde erstmals von Lawson et al. (1994) in gekochtem, gekühlt gelagertem, vakuumverpacktem Schwein nachgewiesen.

Broda et al. (2000a) isolierten *C. algidicarnis* zusammen mit weiteren psychrophilen Clostridien aus verschiedenen vakuumverpackten Fleischproben, die zum Teil Blown Pack Spoilage aufwiesen.

Silva et al. (2011) konnten *C. algidicarnis* in einer aufgeblähten Rindfleischprobe nachweisen, die zusätzlich mit *C. gasigenes* verunreinigt war. Cavill et al. (2011) wiesen *C. algidicarnis* auf vakuumverpacktem Lamm und Rind nach.

Die Untersuchungen von Broda et al. (2009), in denen verschiedene Schlachtbetriebe und deren Umgebung auf das Vorkommen von psychrophilen und psychrotoleranten Clostridien getestet wurde, sprechen ebenfalls dafür, dass der Fleischverderb durch *C. algidicarnis* und *C. putrefaciens* aus dem tiefen Gewebe herrührt, da diese beiden Organismen vorwiegend im Zerlegebereich der Betriebe nachgewiesen wurden.

Silva et al. (2012) untersuchten die Fähigkeit verschiedener Clostridienstämme, Blown Pack Spoilage auszulösen, darunter ein *C. algidicarnis*/*C. putrefaciens*-

bezeichnetes Isolat. Eine genaue Identifizierung, um welchen der beiden genannten *Clostridium* spp. es sich bei diesem Isolat handelte, war den Autoren nicht möglich. Auch Boerema et al. (2002), Broda et al. (2000a), Broda et al. (2003b) und Cavill et al. (2011) berichten, dass diese Keime selbst mit molekularbiologischen Methoden schwer voneinander zu differenzieren sind. Vakuumverpackte Rindfleischproben, die zuvor mit diesem Isolat inokuliert worden waren, zeigten ein enormes Aufgasen nach einer achtwöchigen Lagerungsdauer bei +2 °C. Diese Ergebnisse wichen von den bisherigen Erkenntnissen zum Verderbsgeschehen bei Beteiligung von *C. putrefaciens* und *C. algidicarnis*, dem sogenannten Bone Taint Spoilage ab. Laut Silva et al. (2012) weist die Gasbildung in den jeweiligen Proben auf das Vorhandensein von *C. putrefaciens* hin, da bereits Sturges und Drake (1927) berichteten, dass *C. putrefaciens* in der Lage ist, Gas aus Glucose zu produzieren.

Tabelle 6: Von Fleischproben isolierte psychrotolerante *Clostridium* spp. mit ihren Wachstumstemperaturbereichen und -optima

Keim	Ursprung	Wachstumstemperaturbereich	Optimum
<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i>	Aufgeblähtes, importiertes, vakuumverpacktes Rind ⁽¹⁾	-2 bis +20 °C ⁽²⁾	+10 °C ⁽³⁾
<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i>	Aufgeblähtes, vakuumverpacktes Rind aus den USA ⁽⁴⁾	-2 bis +20 °C ⁽²⁾	+10 °C ⁽³⁾
<i>C. algidicarnis</i>	Gekochtes, vakuumverpacktes, gekühltes Schwein ⁽⁵⁾	+4 bis +40 °C ⁽⁵⁾	+25 bis +30 °C ⁽⁵⁾
<i>C. algidixylanolyticum</i>	Vakuumverpacktes, nicht ordnungsgemäß gekühltes Lamm, Neuseeland, ⁽⁶⁾	+2,5 bis +32,2 °C ⁽⁶⁾	+26 °C ⁽⁶⁾
<i>C. putrefaciens</i>	Gepökelter Schinken ⁽⁷⁾	< 0 °C bis < +37 °C ⁽⁸⁾	+20 bis +25 °C ⁽⁸⁾
<i>C. gasigenes</i>	Aufgeblähtes, gekühltes vakuumverpacktes Lamm aus Neuseeland ⁽⁹⁾	-1,5 bis +26 °C ⁽⁹⁾	+20 bis +22 °C ⁽⁹⁾
<i>C. frigidicarnis</i>	Verdorbenes vakuumverpacktes Rind, Neuseeland ⁽¹⁰⁾	+3,8 bis +40,5 °C ⁽¹⁰⁾	+30 bis +38,5 °C ⁽¹⁰⁾

⁽¹⁾ Dainty et al. (1989) ⁽²⁾ Yang et al. (2009b) ⁽³⁾ DSMZ ⁽⁴⁾ Kalchayanand et al. (1989)
⁽⁵⁾ Lawson et al. (1994) ⁽⁶⁾ Broda et al. (2000b) ⁽⁷⁾ McBryde (1911) ⁽⁸⁾ Sturges und Drake (1927)
⁽⁹⁾ Broda et al. (2000c) ⁽¹⁰⁾ Broda et al. (1999)

Eine andere Erklärung für die Gasbildung in den Proben ist laut Silva et al. (2012) das Vorhandensein von *Enterobacteriaceae*. Diese Mikroorganismen können sich nur bei einem bestimmten pH-Wert vermehren (vgl. Kap. 2.2.1.). Einige Vertreter aus der Gruppe der *Enterobacteriaceae* sind ebenfalls in der Lage Gas zu produzieren und somit Blown Pack Spoilage auszulösen (Brightwell et al., 2007; Chaves et al., 2012). Tabelle 6 beinhaltet eine Zusammenfassung der von vakuumverpacktem Fleisch isolierten *Clostridium* spp.

2.3 Nachweis von psychrotoleranten *Clostridium* spp.

2.3.1 Kultureller Nachweis von psychrotoleranten *Clostridium* spp.

Die Anzucht und der Nachweis von kälteliebenden Clostridien, die zu Blown Pack Spoilage führen können, ist problematisch und erfordert Zeit (Brightwell et al., 2012). Mit den üblichen Nährmedien und Techniken, die zur Isolierung und Auszählung bekannter mesophiler Clostridien verwendet werden, die zu Lebensmittelinfektionen und –intoxikationen führen können, gelingt der Nachweis psychrotoleranter Clostridien nicht (Broda et al., 1998; De Lacy et al., 1998). So beschreibt etwa Mead (1992), dass Nährmedien, bei denen Sulfid zu Sulfid reduziert wird und die zur Routinediagnostik für mesophile Clostridien aus Lebensmitteln eingesetzt werden, bei einer Vielzahl von Clostridien das Wachstum der vegetativen Keime hemmen können.

In der Vergangenheit wurde in mehreren Fällen, in denen es zum Verderb von gekühltem, vakuumverpacktem Rindfleisch kam und wo bei den mikrobiologischen Routineuntersuchungen des Fleisches zunächst keine Mikroorganismen identifiziert werden konnten, die für den Verderb verantwortlich waren, schließlich kälteliebende Clostridien nachgewiesen (Broda et al., 1996a und 1996b; Dainty et al., 1989; Kalchayanand et al., 1989).

Auch in den Untersuchungen von Boerema et al. (2003) zeigten sich Probleme beim kulturellen Nachweis der psychrophilen Clostridien. So war die kulturelle Anzucht nur bei drei von zehn Proben, die bereits ein positives PCR-Ergebnis für den Nachweis von *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Organismen erbracht hatten, erfolgreich. Ebenso verhielt es sich mit der Anzucht von *C. gasigenes*, die nur in sechs von 13 Fällen gelang.

Die Untersuchungen von Broda et al. (1998) ergaben, dass aufgrund der Vielfalt an psychrotrophen Clostridien, die zum Fleischverderb führen können, die Festlegung

auf ein einziges Medium zur Anzucht dieser Bakterien nicht möglich ist. Die besten Ergebnisse für Clostridien mit einem Wachstumsoptimum zwischen +15 und +20 °C wurden in dieser Studie mit unselektiven Nährmedien wie PYGS-Agar, Restricted Clostridial Medium (RCM) oder CBA erzielt. Die Anreicherung der Clostridien gelang durch die Verwendung von 24- oder 48- Stundenkulturen in PYGS-Bouillon nach Lund et al. (1990).

Tabelle 7: Koloniemorphologie und Wachstumsoptimum von einigen psychrotoleranten Clostridienspezies

Stamm	Wachstums- optimum	Koloniemorphologie	ß-Hämolyse	Referenz
<i>C. algidixylanolyticum</i>	+25,5 – +30 °C	<u>CBA</u> : Durchmesser 0,8-2,5 mm, Ränder scharf begrenzt, rund, grau bis weiß, durchscheinend	ja	Broda et al. (2000b)
<i>C. bowmanii</i>	+12 – +16 °C	<u>CBA</u> : Durchmesser 1-2 mm, rund, Ränder grob gekörnt, leicht erhaben, glatt, creme-weiß bis grau, halbtransparent bis opak	nein	Spring et al. (2003)
<i>C. frigidicarnis</i>	+30 – +38,5 °C	<u>CBA</u> : Durchmesser 2,2-7,5 mm, Ränder wellig oder gelappt, rund bis unregelmäßig, cremegrau bis grau, opak bis durchscheinend	ja	Broda et al. (1999)
<i>C. frigoris</i>	+5 – +7 °C	<u>CBA</u> : Durchmesser 1-2 mm, Ränder grob gekörnt, rund, leicht erhaben, glatt, creme-weiß bis grau, halbtransparent bis opak	nein	Spring et al. (2003)
<i>C. gasigenes</i>	+20 – +22 °C	<u>CBA</u> : Durchmesser 0,7-3 mm, Rand scharf begrenzt, konvex, grauweiß bis grau, glänzend	ja	Broda et al. (2000c)
<i>C. lacusfryxellense</i>	+8 – +12 °C	<u>CBA</u> : Durchmesser 1-2 mm, Ränder grob gekörnt, rund, leicht erhaben, glatt, creme-weiß bis grau, halbtransparent bis opak	nein	Spring et al. (2003)
<i>C. psychrophilum</i>	+4 °C	<u>CBA</u> : Durchmesser 1-2 mm, Ränder grob gekörnt, rund, leicht erhaben, glatt, creme-weiß bis grau, halbtransparent bis opak	nein	Spring et al. (2003)
<i>C. tagluense</i>	+15 – +20 °C	<u>PY</u> : Durchmesser 1-2mm, rund, konvex, cremefarben	k. A.	Suetin et al. (2009)
TC 1	+23 – +24 °C	<u>CBA</u> : Durchmesser 3mm, wellige Ränder, rund, matt	ja	Moschonas et al. (2012)
<i>C.</i> = <i>Clostridium</i> ; CBA = Columbia Blood Agar; PY = Pepton Yeast Agar; k. A. = keine Angabe				

Bis heute wurde kein allgemeingültiges Nährmedium für die Anzucht von psychrotoleranten Clostridien gefunden. Seit den Untersuchungen von Broda et al. (1998) wurde eine Vielzahl neuer psychrotoleranter Clostridien entdeckt, die zum Teil unterschiedliche Wachstumsoptima haben (Tabelle 7). In den meisten neueren Studien wird zur kulturellen Anzucht dieser Bakterien PYGS-Bouillon sowie CBA verwendet (Brightwell et al., 2012; Moschonas et al., 2012; Yang et al., 2014b).

Essentiell für eine erfolgreiche Anzucht von psychrophilen Clostridien ist die Verwendung von vorreduzierten Medien und die Inkubation unter anaeroben Bedingungen sowie bei dem für das jeweilige Bakterium erforderliche Wachstumsoptimum (Böhm, 2013; Moschonas et al., 2009).

2.3.2 Molekularbiologischer Nachweis von psychrotoleranten *Clostridium* spp.

Helps et al. (1999) beschrieben die erste PCR-Nachweismethode für *C. estertheticum* (DSMZ 8809). Die verwendeten Primer binden am 16S rDNA Gen von *C. estertheticum* und bilden ein Amplifikat mit einer Größe von 641 Basenpaaren (bp).

Broda et al. (2003a) etablierten eine Methode zum Nachweis von *C. estertheticum* und *C. gasigenes*, die ebenfalls auf 16S rDNA-Basis beruht. Die Primer sind komplementär zu den variablen Regionen V1 und V6 des jeweiligen 16S rRNA Gens. Das Primerpaar 16SDBF/16SDBR zum Nachweis von *C. gasigenes* bildet ein Amplifikat mit einer Größe von 935 bp. Das Primerset 16SEF/16SER dient dem Nachweis von *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Organismen und bildet ein Amplifikat mit einer Länge von 790 bp. Außerdem entwickelten Broda et al. (2003a) ein weiteres Primerpaar (EISRF/EISRR), das an der Internal Transcribed Spacer (ITS) Region zwischen dem 16S und dem 23S rDNA-Gen von *C. estertheticum* bindet. Es bildet ein PCR-Produkt mit einer Größe von 235 bp. Mit diesem Primerpaar kann man zwischen CEE/CEL und *C. estertheticum*-like Organismen unterscheiden.

Seit der Entwicklung des Primerpaares 16SEF/16SER durch Broda et al. (2003a) wurden laut Cavill et al. (2011) einige neue Clostridienspezies entdeckt. Laut Brightwell et al. (2012) unterscheidet sich die Gensequenz von einigen dieser neuen Spezies nur geringfügig von der Gensequenz des Primerpaares 16SEF/16SER. Auch Cavill et al. (2011) berichten, dass die Gensequenz von *C. lacusfryxellense*, *C. frigoriphilum* und *C. bowmanii* nur minimale Basenabweichungen zu dem

genannten Primerset zeigt. Aus diesem Grund ist laut Cavill et al. (2011) die alleinige Anwendung dieses Primerpaares für einen spezifischen Nachweis von *C. estertheticum* nicht ausreichend, da diese neuen Spezies zu einer Kreuzreaktion mit dem 16SEF/16SER Primerset führen könnten.

Zum Nachweis von *C. algidicarnis* und *C. putrefaciens* entwickelten Boerema et al. (2002) das Primerset CAF/CAR. Dieses bindet an den Regionen V1 und V6 des 16S rRNA Gens und bildet ein Amplifikat mit einer Länge von 756 bp. *C. algidicarnis* und *C. putrefaciens*, die als Verursacher des sogenannten „Bone Taint Spoilage“ gelten (vgl. 2.2.3.3), weisen im Bereich der hoch variablen, speziesspezifischen Regionen V1 und V6 der 16S rDNA-Gensequenz eine hohe Homogenität auf (Boerema et al., 2002). Aus diesem Grund kann man mit dem Primerpaar CAF/CAR nicht unterscheiden, ob es sich bei dem eingesetzten DNA-Template um *C. algidicarnis* oder um *C. putrefaciens* handelt.

In den letzten Jahren hat der quantitative PCR-Nachweis mittels real-time PCR deutlich an Bedeutung gewonnen. Cavill et al. (2011) berichten, dass sie bereits seit 2002 eine quantitative real-time PCR (qPCR) zum Nachweis von *C. estertheticum* einsetzen. Jones et al. (2009) entwickelten in Neuseeland ebenfalls eine qPCR zum Nachweis von *C. estertheticum*. Die qPCR von Yang et al. (2010b) aus Kanada, bei der das Primerset 16SEF/16SER von Broda et al. (2003a) zum Nachweis von *C. estertheticum* eingesetzt wird, kann bis zu 0,025 pg DNA aus Sporen dieses Keims nachweisen. Brightwell et al. (2012) entwickelten ebenfalls eine real-time PCR unter Verwendung des Primersets 16SEF/16SER von Broda et al. (2003a), mit der neben *C. estertheticum* auch einige *C. estertheticum*-like Isolate sowie *C. bowmanii* und *C. lacusfryxellense* erfasst werden. Die direkte Nachweisgrenze des real-time PCR-Ansatzes ohne vorherige Anreicherung der Proben liegt dabei für Fleisch, Fell, Blut/Tropfsaft sowie Umweltproben bei 3 Sporen pro ml, für Fäzes bei 3×10^3 Sporen pro ml. Der direkte Nachweis von Sporen aus Bodenproben war nicht möglich. Biologisches Probenmaterial kann auf Grund seiner Zusammensetzung Stoffe enthalten, die einen inhibitorischen Effekt auf den PCR-Nachweis haben können (Abu Al-Soud und Radstrom, 2000). Laut Brightwell et al. (2012) bewirkt eine Anreicherung dieser Proben, dass die inhibitorischen Bestandteile der Probe verdünnt und daher minimiert werden.

Tabelle 8: PCR-Nachweismethoden für psychrotolerante *Clostridium* spp. mit ihren Primern, den Zielorganismen und der Länge der jeweiligen Amplifikate

Primer	Target	Amplifikatslänge (bp)	Referenz
Revised Primers	<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i>	641	Helps et al. (1999)
16SDBF/16SDBR	<i>C. gasigenes</i>	935	Broda et al. (2003a)
16SEF/16SER	<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum/laramiense</i> <i>C. estertheticum</i> -like Organismen	790	Broda et al. (2003a)
EISRF/EISRR	<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum/laramiense</i>	230	Broda et al. (2003a)
CAF/CAR	<i>C. algidicarnis</i> , <i>C. putrefaciens</i>	756	Boerema et al. (2002)

C. = *Clostridium*; bp = Basenpaare

2.3.3 Typisierung und Sequenzierung von psychrotoleranten *Clostridium* spp.

Laut Redemaker et al. (2006) ist der Nachteil bei der Anwendung von mikrobiologischen Routineuntersuchungen zum Nachweis von strikten Anaerobiern wie psychrotoleranten Clostridien, dass diese eine fehlende Spezies- und Stammspezifität aufweisen. Auch Broda et al. (2000a) bemängeln, dass keine selektiven Medien oder kommerziellen Systeme zur Identifizierung von psychrophilen bzw. psychrotrophen Clostridien existieren. Eine Möglichkeit zur weiteren Differenzierung psychrotoleranter Clostridien besteht in der Untersuchung des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (Broda et al., 2000a). Dabei wird die genomische DNA der Stämme mittels Restriktionsendonukleasen geschnitten, sodass verschieden lange Teilstücke entstehen. Diese werden anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die charakteristischen Muster, die dabei entstehen, werden mit den Mustern von Referenzstämmen verglichen (Newton und Graham, 1997).

Eine weitere Möglichkeit zur genaueren Typisierung der kälteliebenden Clostridien ist die Gensequenzanalyse des 16S rDNA Gens. Bei der Amplifikation des 16S rDNA Gens wird die genomische DNA als PCR-Template in eine Polymerasekettenreaktion

mit universellen Bakterienprimern eingesetzt. Diese Primer sind komplementär zu Regionen am 5' und 3' – Ende des 16S rRNA Gens. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird das Amplikon aufgereinigt und sequenziert und kann nun mit Sequenzen des 16S rDNA Gens von psychophilen Clostridien verglichen werden, die in öffentlichen Datenbanken hinterlegt sind. Genbank (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory) und DDBJ (DNA Data Bank of Japan) sind derartige Datenbanken (Mäde, 2010).

Die von Broda et al. (2000c) angedachte Verwendung des Polymorphismus der ITS-Region zur Differenzierung von psychophilen und psychrotrophen Clostridien stellte sich in den Untersuchungen von Broda et al. (2003b) als ungeeignet heraus.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Alle für den praktischen Teil der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die mit DSMZ bezeichneten Stämme wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig bezogen. Die übrigen verwendeten Bakterien stammen aus der Sammlung des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Institutes.

Tabelle 9: Übersicht über alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Spezies	Stamm-Nummer	Herkunft
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	DSMZ 30014	Pasteurisierte Milch
<i>Clostridium algidicarnis</i>	DSMZ 15099	Vakuumverpacktes gefrorenes Schweinefleisch
<i>Clostridium algidixylanolyticum</i>	DSMZ 12273	Vakuumverpacktes Lamm
<i>Clostridium bowmanii</i>	DSMZ 14206	Seesedimentprobe, Antarktis
<i>Clostridium butyricum</i>	DSMZ 10702	Darm (Schwein)
<i>Clostridium butyricum</i>	DSMZ 2478	Seesediment, USA
<i>Clostridium carnis</i>	DSMZ 1293	Blutkultur (Mensch)
<i>Clostridium chauvoei</i>	DSMZ 7528	Rauschbrand (Rind)
<i>Clostridium difficile</i>	DSMZ 1296	Darm (Kind)
<i>Clostridium difficile</i>	DSMZ 12056	Pansen (Lamm)
<i>Clostridium frigidicarnis</i>	DSMZ 12271	Vakuumverpacktes Rind
<i>Clostridium frigroris</i>	DSMZ 14204	Seesedimentprobe, Antarktis
<i>Clostridium gasigenes</i>	DSMZ 12272	Vakuumverpacktes, gekühltes Lamm
<i>Clostridium perfringens</i>	DSMZ 756	Rind
<i>Clostridium putrefaciens</i>	DSMZ 1291	Schinken
<i>Clostridium septicum</i>	DSMZ 7534	k. A.; Typstamm
<i>Clostridium subterminale</i>	DSMZ 6970	k. A.; Typstamm
<i>Clostridium subterminale</i>	DSMZ 2636	k. A.
<i>Clostridium tagluense</i>	DSMZ 17763	Permafrost, Kanada
<i>Clostridium tetanomorphum</i>	DSMZ 4474	Septische Wunde
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	DSMZ 2637	k. A.; Typstamm
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	DSMZ 664	Rohmilch
<i>Clostridium vincentii</i>	DSMZ 10228	Anaerobes Sediment, Antarktis
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSMZ 30053	Auswurf
<i>Hafnia alvei</i>	DSMZ 30163	k. A.; Typstamm
<i>Proteus vulgaris</i>	DSMZ 2140	Infektion des Innenohrs
<i>Proteus vulgaris</i>	DSMZ 13387	k. A.; Neo-Typstamm
<i>Shewanella putrefaciens</i>	DSMZ 6067	k. A.; Typstamm
<i>Weissella viridescens</i>	DSMZ 20410	Selchfleisch
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSMZ 4780	Rotz-ähnliche Gesichtsinfektion
<i>Bacillus cereus</i>	B 175	DSMZ 4313; Zwischenfall einer Lebensmittelvergiftung
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Mb 24	DSMZ 20171; frische Schweinewurst
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 194	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 195	Vakuumverpacktes Rindfleisch

Fortsetzung Tabelle 9

Spezies	Stamm-Nummer	Herkunft
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 196	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 197	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 198	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 199	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 200	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 201	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 202	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 203	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 204	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 205	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 206	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 207	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 208	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 209	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 210	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 211	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i>	C 212	Verdorbenes rohes Rindfleisch
subsp. <i>laramiense</i>		
<i>Clostridium estertheticum</i>	C 213	Vakuumverpacktes Rindfleisch
subsp. <i>estertheticum</i>		
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 214	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 215	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	C 216	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i>	C 217	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i>	C 218	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium estertheticum</i>	C 243	Vakuumverpacktes Rindfleisch
<i>Clostridium perfringens</i>	C 94	NCTC 528; Gasbrand (Mensch)
<i>Clostridium sporogenes</i>	C 154	DSMZ 633; Silage
<i>Enterococcus faecalis</i>	Lb 1225	DSMZ 2570; Urin
<i>Escherichia coli</i>	E 9	ATCC 11775; Urin
<i>Escherichia coli</i>	E 134	ATCC 35150; Stuhl (Mensch)
<i>Lactobacillus brevis</i>	Lb 1247	DSMZ 20054; Fäzes
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Lb 638	Südafrika
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Lb 1212	DSMZ 20174; Sauerkraut
<i>Listeria monocytogenes</i>	Li 130	DSMZ 20600; Kaninchen
<i>Listeria monocytogenes</i>	Li 140	DSMZ 19094; Geflügel
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PS 80	DSMZ 50071; k. A.; Typstamm
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PS 88	DSMZ 50090; Vorabscheider
<i>Pseudomonas fragi</i>	PS 86	DSMZ 3456; k. A.; Typstamm
<i>Pseudomonas lundensis</i>	PS 94	DSMZ 6252; abgepacktes Rind
<i>Pseudomonas putida</i>	PS 89	DSMZ 291; k. A.; Typstamm
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	S 689	DSMZ 14846; k. A.
<i>Serratia marcescens</i>	SM 15	ATCC 13880; Schmutzwasser
<i>Staphylococcus aureus</i>	St 9	ATCC 6538; Wunde (Mensch)
<i>Staphylococcus aureus</i>	St 1	ATCC 14458; Fäzes (Mensch)
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>humanus</i>	Str 44	k. A.

B: *Bacillus*; C: *Clostridium*; E: *Escherichia*; Lb: *Lactobacillus*; Li: *Listeria*; Mb: *Microbacterium*; PS: *Pseudomonas*; S: *Salmonella*; SM: *Serratia*; St: *Staphylococcus*; Str: *Streptococcus*; k. A.: keine Angabe; ATCC: American Type Culture Collection, Manassas; DSMZ: Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; NCTC: National Collection of Type Cultures, London

3.1.2 Probenmaterial - Tupferproben

Bei den Tupferproben handelt es sich um Oberflächenproben aus drei verschiedenen fleischverarbeitenden Betrieben. Betrieb A wurde zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt (Juli 2009, Dezember 2009, März 2010, Juni 2010). Bei Betrieb B erfolgten zwei Beprobungen, die erste Probenahme fand im August 2009 statt, die zweite im April 2010. Auch in Betrieb C erfolgten zwei Probenahmen, der erste Besuch fand im Juli 2009 statt, die zweite Beprobung im September 2009. Eine Übersicht über die untersuchten Betriebe bezüglich Land, Anzahl der Beprobungen sowie Gesamtprobenzahl aus den jeweiligen Betrieben gibt Tabelle 10.

Tabelle 10: Überprüfte Betriebe, Anzahl der Probenahmen und Anzahl der auf psychrotolerante Clostridien analysierten Tupferproben

Betrieb	Land	Anzahl der Beprobungen	Probenanzahl insgesamt
A	Deutschland	4	76
B	Deutschland	2	40
C	Europäisches Ausland	2	32

3.1.3 Kulturelle Verfahren

Nachfolgend sind die Verbrauchsmaterialien und Geräte für die kulturellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zusammengefasst.

Verbrauchsmaterial:

Agar-Agar (Merck, 1.01614.1000)

Anaeroclip (Merck, 1.14226.001)

Anaerocult A mini Spezialbebrütungsbeutel (Merck, 1.01611.0001)

Anaerocult A Spezialbebrütungsplatten (Merck, 1.13829.0001)

Anaerotest Anaerobiose-Indikator (Merck, 115112)

Brain Heart Infusion (Bacto TM, 256120)

Columbia Blutagar (5 % Schafblut)

42 g Columbia-Agar-Basis (Merck, 1.10455.0500)

50 ml Schafblut defibriniert (Acila, 2101012), nach Autoklavieren zugegeben

950 ml A. dest.

Autoklavieren bei 121 °C, 15 min

DHL-Agar nach Sakazaki (Merck 1.11435.0500)

DSMZ-Medium 63, pH=6,8 (modifiziert nach Spring et al., 2003):

0,5 g K_2HPO_4 (Merck, 5104.100)
1,0 g NH_4Cl (Merck, 1145)
1,0 g Na_2SO_4 (Merck, 1.06649.1000)
0,1 g $CaCl_2 \times 2 H_2O$ (Merck, 2382)
2,0 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$ (Merck, 818A335586)
2,0 g DL-Natrium-Lactat (Merck, 6522.0500)
2,0 g Hefeextrakt (Merck, 103753.0500)
0,5 g $FeSO_4 \times 7 H_2O$ (Merck, 317K2389165)
0,1 g Natriumthioglycolat (BAG, 7749)
0,1 g Ascorbinsäure (Merck, 814F905627)
1,0 mg Resazurin (Sigma-Aldrich, 199303-5G)
2,0 g Trypticase Pepton (Difco, 0123-17)
Natronlauge 2N (Einstellen des pH-Wertes)
ad 1000 ml A. dest.

Gasperlen, Durchmesser 3 mm (VWR; HECH1401/3)

Impfösen aus Kunststoff, steril, 10 μ l (VWR, 612-9358)

Impfösen aus Kunststoff, steril, 1 μ l (VWR, 612-9356)

Impfösen aus Platindraht

MRS-Agar nach De Man, Rogosa und Sharpe (Merck, 1.1.0660.0500)

MRS-Bouillon nach De Man, Rogosa und Sharpe (Merck, 1.10661.0500)

MSE-Agar, pH=7,0:

5 g Fleischextrakt (Merck, 1.03979)
10 g Universalpepton (Merck, 1.07043)
70 g Natriumchlorid (Merck, 1.06400)
5 g Lithiumchlorid (Merck, 1.05679)
10 g Mannit (Merck, 1.05987)
15 g Agar (Merck, 1.01614)
Natronlauge 2N (Einstellen des pH- Wertes)
2 Eigelb gelöst in 50 ml 0,85 %iger Kochsalzlösung nach Autoklavieren zuge-
geben
ad 900 ml A. dest.

Natriumchlorid (Merk, 1.06404.1000)

PBS, pH=7,5:

8,5 g NaCl (Merck, 106404.1000)
1,14 g $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$ (Merck, 106579.1000)
0,5 g KH_2PO_4 (Merck, 104873)
Natronlauge 2N (Einstellen des pH-Wertes)
ad 1000 ml A. dest.
Autoklavieren bei 121 °C, 15 min

PYGS-Bouillon (Lund et al., 1990):

- 5 g Proteose Pepton (Acila, ADR0240)
- 5 g Trypton (Pepton aus Casein pankreatisch verdaut, Merck, 1.02239.0500)
- 10 g Hefeextrakt granuliert (Merck, 1.03753.0500)
- 10 g Fleischextrakt granuliert (Merck, 1.03979.0500)
- 2 g Glucose-Monohydrat (Merck, 1.08342.1000)
- 1 g Stärke löslich (Merck, 1.01257.0050)
- 0,001 g Resazurin-Natriumsalz (Sigma-Aldrich, 199303-5G)
- 40 ml Salzlösung A, Zusammensetzung pro Liter:
 - 0,265 g $\text{CaCl} \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, 1.02382.0250)
 - 0,48 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, 1.05886.0500)
 - 2,0 g NaCl (Merck, 106404.1000)
- 40 ml Salzlösung B, Zusammensetzung pro Liter:
 - 1,0 g KH_2PO_4 (Merck, 4873.1000)
 - 1,3 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, 5104.1000)
 - 10,0 g NaHCO_3 (VWR, 27775.293)
- ad 1000 ml A. dest.
- Autoklavieren bei 121 °C, 15 min

Sporulation Medium (Peck et al., 1992):

Untere feste Phase:

- 10,0 g Cooked Meat Medium (Difco, 226730)
- 1,5 g Agar-Agar (Roth, 5210.3)
- 0,1 g Glucose (Merck, 108342.1000)
- 100 ml A. dest.

Obere flüssige Phase:

- 13,3 ml A. dest. steril.

Standard-I-Agar (Merck, 1.07881.0500)

Standard-I-Bouillon (Merck, 1.07882.0500)

Stomacher-Beutel (VWR, 129-9868)

Geräte:

- Anaerobe Arbeitsstation (Meintrap DWS, MiniMaks)
- Anaerobiotopf „AnaeroJar“ (Oxoid, AG0025A)
- Analysenwaage (Sartorius, KB BA 100)
- Gefriertrocknungsanlage (Christ, alpha 2-4, Typ-Nr. 100402)
- Glaspipetten 1 ml und 10 ml (Brand)
- Klimabox +20 °C
- Kühlraum +4 °C (Weiss)
- Nährmedien-Abfülleinheit (Integra Biosciences, Tecnomat)
- Pipettierhilfe (Integra Biosciences, Pipet-Boy acu)
- Schüttler (Scientific Industries, Vortex-Genie 2T)
- Stomacher (Seward, Stomacher 400 circulator)
- Thermostatschränke +1 °C und +15 °C (Aqualytic)
- Waage (Sartorius, 1409004)
- Wärmeschränk +10 °C (WTB Binder)
- Zentrifuge (Hettich Mikro 22R)

3.1.4 Polymerasekettenreaktion

Nachfolgend sind die Verbrauchsmaterialien und Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zusammengefasst.

Verbrauchsmaterialien:

Primer (Eurofins MWG Operon, Konzentration 100 pmol/μl):

CBf: 5'-TAT CAA AGG ATT CTC TTC GGA G-3'

CBr: 5'-GGA CTT CAC CCA TCT CTG G-3'

16 SEF: 5'-TCG GAA TTT CACTTTGAG-3'

16 SER: 5'-AAG GAC TTC ACT CAT CTC TG-3'

EISRF: 5'-GTA GAT GTA TTG ACT TCG G-3'

EISRR: 5'-ACC TAT AAC ACA TCT CGT-3'

CFf: 5'-CGC ATG ATC GAA ACA TCA AAG GAA TAA TC-3'

CFr: 5'-GCG GAA TAC TTA ATG TGT TAA CGG-3'

16 SDBF: 5'-GAG AGG AGT TCT TCG GAA CGA-3'

CGr: 5'-CCA GTT TGA AAT GCA GTT CTC G-3'

HB10: 5'-ATT CCA CAC AAC ATA CGA GCC-3'

HB11: 5'-GTT TCG CCA CCT CTG ACT TGA G-3'

Biozym LE Agarose (Biozym, 840004)

DNA Marker Quantitas Leiter 50bp – 2kb (Biozym, 250204)

DNA Polymerase (Pqlab, Taq-DNA-Polymerase, 01-1040)

inklusive Reaktionspuffer S (15 mM MgCl₂)

DNA Polymerase (Pqlab, Hot Taq-DNA-Polymerase, 01-8130)

inklusive Reaktionspuffer S (15 mM MgCl₂)

dNTP- Set 1 (Fermentas R0181), Einzellösungen 100 mM, Gebrauchslösung 10 mM

Ethidiumbromidlösung 1 % (AppliChem, A1152.0025)

Experion DNA 1K Analysis Kit (BioRad, 700-7107)

Gel-Loading-Puffer:

62,5 mg Bromphenolblau (Merck, 108122)

62,5 mg Xylencyanol (Merck, 110590)

6,25 g Ficoll Typ 400 (Sigma-Aldrich, F4375-10G)

ad 25 ml A. dest.

High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, 1 796 828)

Lysing Matrix E (MP Biomedicals, 6914-500)

Lysozym (Serva, 28262)

10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey und Nagel, 740609.250)

Pipetten-Standard-Spitzen

10 µl (Biozym 720031)

100 µl (VWR, 613-0252)

1000 µl (Eppendorf, 0030 000.919)

PUC 19 DNA (Fermentas, SD0061)

Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf, 0030123.328), 2,0 ml (Eppendorf, 022363344) und 0,2 ml (Biozym, 711080)

TBE-Puffer Stammlösung, pH = 8,3:

890 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, 108382.0500)

890 mM Borat (Merck, 100165.1000)

25 mM EDTA (= Titriplex III) (Merck, 108418)

ad 1000 ml A. bidest.

Autoklavieren bei 121 °C, 15 min

TBE-Puffer Gebrauchslösung:

100 ml TBE-Puffer Stammlösung

ad 1000 ml A. bidest.

Geräte:

Elektrophoresekammern (Biometra, Agagel mini und Agagel midi-wide)

Experion System (BioRad, 701-7000)

Fast-Prep-Gerät (Hybaid, Ribolyser)

Heizblock für Reaktionsgefäße (Thermomixer comfort, Eppendorf)

PCR-Werkbank (UV Sterilizing Working Station, PeqLab)

Pipetten (ABIMED Discovery 2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)

Power Supply (Biometra Standard Power Pack P25)

Schüttelapparat (GFL 3012)

Thermocycler (Biorad, C1000)

Transilluminator mit Fotoeinheit (Biometra)

Zentrifuge (MiniSpin Plus, Eppendorf)

3.1.5 Sonstige Materialien und Geräte

Autoklav (Zirbus, LSA 500-2 und IBS Fedegari, NB 1691AM)

Cacodylatpuffer 0,1 M, pH=7,2 (Serva, 15540)

Deckgläser für Objektträger (24 x 24 mm) (Gerhard Menzel GmbH, BB020020A1)

Deckgläser, rund, Durchmesser 10 mm (neoLab, 1-6282)

Dosierpumpe (Integra Biosciences, Dose-it 803)

Fixationsgemisch für Rasterelektronenmikroskopie:

31,25 ml 25 %iges Glutaraldehyd (Merck, 820603)

218,75 ml 0,1 M Cacodylatpuffer (Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat, Merck, 820670)

125 mg Rutheniumrot (Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH, 3F153)

Glaspetrischalen, Durchmesser 3 cm

Heißluftsterilisator (Binder)

Kritisch-Punkt-Apparat CPD 030 (Balzers Union)

Kühlakkus

Messzylinder 10 ml, 100 ml (Brand)

Mikroskop (Leitz Diaplan und Biomed)

Mikroskopkamera mit Software (Leica EC3)

Milchsäure-Anilinblaumischung:

1 g Anilinblau (Riedel-De Haen AG, 32703)

ad 1000 ml Milchsäure, etwa 90 % reinst (Merck, 729K784166.366)

Objektträger (Marienfeld und Menzel-Gläser)

Osmiumtetroxid, 1 %ig (Plano, R1017)

Pasteurpipetten, 230 mm (Brand, 747720)

Plättchen aus Edelstahl, 7 x 7 cm (selbst hergestellt)

Plättchen aus Polyethylen, 7 x 7 cm (selbst hergestellt)

Rasterelektronenmikroskop (Hitachi S 3000N)

Reagenzgläser (Schott, Durchmesser 16 mm)

Rinderserum, steril (ACILA, 2202012)

Sputter Anlage (Balzers Union)

Ultraschallwasserbad (Branson B12, 65 W, 48 kHz)

Wattetupfer (Neolab, 20001021)

Zählkammer nach Thoma (Laboroptik)

3.2 Methoden

3.2.1 Vergleich psychrotoleranter *Clostridium* spp.

Da in der Literatur teilweise unterschiedliche Angaben zu den phänotypischen Eigenschaften von einigen psychrotoleranten *Clostridium* spp. gemacht werden, wurden sechs verschiedene psychrotolerante Clostridien kultiviert und beschrieben sowie die Ergebnisse mit denen anderer Autoren verglichen. Mit den nachfolgend beschriebenen Untersuchungsmethoden wurden *C. bowmanii* (DSMZ 14206), *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* (DSMZ 8809), *C. estertheticum* subsp. *laramiense* (DSMZ 14864), *C. estertheticum*-like Organismus C194, *C. frigoris* (DSMZ 14204) und *C. gasigenes* (DSMZ 12272) (Tabelle 11) näher charakterisiert.

3.2.1.1 Kultivierungsbedingungen

Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten in einer anaeroben Arbeitsstation (Meintrup DWS, MiniMaks) und unter Kühlung mittels handelsüblicher Kühlakkus. Alle Medien, die zum Nachweis von anaeroben Bakterien dienten, wurden vor der Verwendung vorreduziert, indem sie 24 Stunden unter anaeroben Bedingungen gelagert wurden.

Die sechs gefriergetrockneten Teststämme wurden zunächst in 1,5 ml vorreduzierter PYGS-Bouillon gelöst und zwei Stunden resuspendiert. Nach dem Resuspendieren wurden die einzelnen Stämme auf vorreduzierten CBA-Platten ausgestrichen.

Anschließend wurden die beimpften Platten in anaerobe Spezialbebrütungsbeutel (Anaerocult A mini) verpackt und nach dem Ausschleusen aus der anaeroben Arbeitsstation bei dem jeweiligen Temperaturoptimum der einzelnen Stämme für 20 bzw. 28 Tage in Brutschränken inkubiert (Tabelle 11).

Die übrigen Bakteriensuspensionen der reaktivierten Keime wurden in 9 ml vorreduzierte PYGS-Bouillon-Röhrchen verbracht und ebenfalls in anaerobe Spezialbebrütungsbeutel verpackt.

Nach dem Ausschleusen aus der anaeroben Arbeitsstation erfolgte eine vierwöchige Inkubation der beimpften PYGS-Bouillon-Röhrchen bei dem jeweiligen Temperaturoptimum.

Tabelle 11: Herkunft, Anzuchttemperatur und Bebrütungszeit der verwendeten psychrotoleranten *Clostridium* Referenz-Stämme auf CBA-Platten

Keim	Herkunft	Anzuchttemperatur	Bebrütungszeit
<i>Clostridium bowmanii</i>	DSMZ 14206	+15 °C	20 Tage
<i>Clostridium estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i>	DSMZ 8809	+10 °C	20 Tage
<i>Clostridium estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i>	DSMZ 14864	+10 °C	28 Tage
<i>Clostridium estertheticum</i> -like	MRI C 194	+10 °C	20 Tage
<i>Clostridium frigidis</i>	DSMZ 14204	+5 °C	20 Tage
<i>Clostridium gasigenes</i>	DSMZ 12272	+20 °C	20 Tage

DSMZ: Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; MRI: Max Rubner-Institut

3.2.1.2 Mikroskopische Untersuchung

3.2.1.2.1 Lichtmikroskopie

Nach einer Inkubationszeit von 20 Tagen (*C. bowmanii*, CEE, *C. estertheticum*-like Isolat C 194, *C. frigoris*, *C. gasigenes*) bzw. 28 Tagen (CEL) wurden Präparate für das Lichtmikroskop hergestellt. Dazu wurden 10 µl Milchsäure versetzt mit 0,1 % Anilinblau auf einen zuvor mit 70 %igem Ethanol gereinigten Objektträger verbracht (De Hoog et al., 1995). Mittels einer sterilen Einmalimpföse aus Plastik (VWR) wurde von jeder CBA-Platte Koloniematerial entnommen und auf dem Objektträger mit der Milchsäure-Anilinblaumischung vermengt. Anschließend wurde ein Deckgläschen aufgelegt und die verschiedenen Bakterien unter einem Lichtmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung morphologisch analysiert. Durch die Milchsäure-Anilinblaumischung wurden die Bakterienzellen angefärbt und waren durch den entstandenen Kontrast zum Hintergrund deutlich auf den angefertigten Fotografien zu erkennen (Kapitel 4.1).

3.2.1.2.2 Elektronenmikroskopie

Die Anfertigung der Präparate für das Elektronenmikroskop erfolgte nach Ronner und Wong (1993). Aus jedem der beimpften PYGS-Röhrchen (Kapitel 3.2.1.1) wurden nach der vierwöchigen Inkubation 2 ml Bakteriensuspension in sterile 2 ml Reaktionsgefäße verbracht, die Proben 5 min bei 5200 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet mit 2 ml 0,85 %iger NaCl-Lösung gewaschen.

Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit 250 µl physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert und ein Tropfen der jeweiligen Keimsuspension mittels einer Pasteurpipette auf ein rundes Deckglas gegeben, das sich in einer Glaspetrischale befand.

Anschließend wurde mit einer Pasteurpipette tröpfchenweise ein Fixationsgemisch für Rasterelektronenmikroskopie zugegeben, bis der Boden der Glaspetrischale vollständig bedeckt war. Die Fixierung erfolgte über Nacht.

Danach wurde das Fixationsgemisch wieder abgezogen und die Präparate wurden mit 0,1 M Cacodylat-Puffer in der Glaspetrischale gewaschen. Dazu wurde der Cacodylat-Puffer mit einer Pasteurpipette zugegeben, bis der Boden der Glaspetrischale vollständig bedeckt war, anschließend wurde die Flüssigkeit wieder abgezogen. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Anschließend

wurden die Präparate für zwei Stunden mit 1 %igem Osmiumtetroxid nachfixiert und nochmals zweimal mit A. dest. gewaschen.

Danach wurden sie schrittweise in der Glaspetrischale entwässert, zunächst jeweils 10 min mit 30, 50, 75 und 90 %igem Ethanol, dann jeweils 30 min mit 96 und 100 %igem Ethanol.

Es folgte die Kritisch-Punkt-Trocknung der Präparate im Kritisch-Punkt-Apparat mit anschließender Goldbeschichtung in der Sputter-Anlage. Die fertigen Präparate wurden im Rasterelektronenmikroskop bei 10.000- und 20.000-facher Vergrößerung betrachtet und fotografisch dokumentiert.

3.2.2 PCR-Entwicklung zum Nachweis von *C. bowmanii*, *C. frigoris* und *C. gasigenes*

3.2.2.1. PCR-System und Primer

C. bowmanii und *C. frigoris*

In den Vorversuchen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass mit dem Primerpaar 16SEF/16SER von Broda et al. (2003a) neben *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Organismen auch *C. bowmanii* und *C. frigoris* erfasst werden können. Auch Brightwell et al. (2012) beschreiben die Nachweisbarkeit von *C. bowmanii* mit diesem Primerpaar.

Für den spezifischen Nachweis von *C. bowmanii* und *C. frigoris* wurden zwei neue Primerpaare entwickelt (Zitzlmann, persönliche Mitteilung, 2009), die jeweils an einer spezifischen Region des 16s-rRNA-Gens binden. Das Primerpaar CBf/CBr für den Nachweis von *C. bowmanii* bildete ein Amplifikat mit einer Größe von 808 bp und das Primerpaar CFf/CFr für den Nachweis von *C. frigoris* ein Amplifikat mit einer Größe von 685 bp.

Das Pipettierschema war für beide Nachweise identisch (Tabelle 12), das Cyclerprogramm für beide Primerpaare unterschied sich in der Annealing-Temperatur (Tabelle 13). Der PCR-Mix wurde in der PCR-Werkbank (PeqLab) unter Kühlung nach dem in Tabelle 12 beschriebenen Schema hergestellt. Daraus ergab sich ein Gesamtvolumen von 25 µl pro Ansatz.

Tabelle 12: Pipettierschema für die PCR-Systeme zum Nachweis von *Clostridium bowmanii* und *Clostridium frigidum*

Reagenz	Menge pro Ansatz [µl]	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz
10 x Reaktionspuffer S	2,5	10 x	1 x
Primer CBf bzw. CFf	1,25	10 µM	0,5 µM
Primer CBr bzw. CBr	1,25	10 µM	0,5 µM
dNTP-Mix	0,5	10 mM	200 µM
Taq-Polymerase	0,125	5 U/µl	2,5 U/µl
A. bidest. steril	14,375		
Aufbereitete Proben-DNA	5,0		

Bei jeder PCR-Reaktion wurde eine Positivkontrolle (*C. bowmanii*: DNA des Referenzstammes DSMZ 14206 bzw. *C. frigidum*: DNA des Referenzstammes DSMZ 14204), eine Negativkontrolle (DNA des jeweils anderen Referenzstammes) sowie eine Reagenzienkontrolle (A. bidest. anstelle von DNA) mitgeführt.

Die DNA-Extraktion aus den Referenzstämmen erfolgte durch Anwendung des High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Es wurde dabei das Herstellerprotokoll zur Isolierung von DNA aus Bakterien oder Hefen verwendet, mit den in Tabelle 16 (Kapitel 3.2.2.2) angegebenen Modifikationen.

Die Reaktionsgefäße wurden unmittelbar nach dem Pipettieren in den Thermocycler (Biorad) verbracht und die DNA mit dem in Tabelle 13 beschriebenen Programm amplifiziert.

Tabelle 13: Amplifikationsbedingungen für die PCR-Systeme zum Nachweis von *Clostridium bowmanii* und *Clostridium frigidum*

Anzahl	Schritt		Temperatur	Dauer
1x	Initiale Denaturierung		+93 °C	3 min
30x	Denaturierung		+92 °C	1 min
	Annealing	<i>C. bowmanii</i>	+55 °C	1 min
		<i>C. frigidum</i>	+67 °C	1 min
	Extension		+72 °C	2 min
1x	Extension		+72 °C	3 min

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Reaktionsgefäße bis zur weiteren Verwendung bei +4 °C aufbewahrt.

C. gasigenes

Für den PCR-Nachweis wurde die Methode von Broda et al. (2003a) modifiziert. Das dort beschriebene Primerpaar 16SDBF/16SDBR bindet an einer spezifischen Region des 16s-rRNA-Gens. Der Primer 16SDBR wurde durch den neu entwickelten, spezifischeren Primer CGr (Zitzlmann, persönliche Mitteilung, 2009) ersetzt, der ebenfalls an einer spezifischen Region des 16s-rRNA-Gens bindet.

Das Primerpaar 16SDBF/CGr bildete ein Amplifikat mit einer Größe von 550 bp. Das Pipettierschema entsprach dem aus Tabelle 12. Für den PCR-Nachweis von *C. gasigenes* wurde jedoch eine Hot-Taq-Polymerase (Peqlab) verwendet, um die Sensivität des PCR-Nachweises zu erhöhen.

Jeder PCR-Durchlauf erfolgte unter Mitführung einer Positivkontrolle (DNA des Referenzstammes DSMZ 12272), einer Negativkontrolle (DNA des DSMZ-Stammes 8809) sowie einer Reagenzienkontrolle (A. bidest. anstelle von DNA).

Die DNA-Extraktion aus den Referenzstämmen erfolgte durch Anwendung des High Pure PCR Template Preparation Kit. Es wurde dabei das Herstellerprotokoll zur Isolierung von DNA aus Bakterien oder Hefen verwendet, mit den in Tabelle 16 (Kapitel 3.2.2.2) angegebenen Modifikationen.

Die Reaktionsgefäße wurden unmittelbar nach dem Pipettieren in den Thermocycler verbracht und die DNA mit dem in Tabelle 14 beschriebenen Programm amplifiziert.

Tabelle 14: Amplifikationsbedingungen für das PCR-System zum Nachweis von *Clostridium gasigenes*

Anzahl	Schritt	Temperatur	Dauer
1x	Initiale Denaturierung	+93 °C	180 s
30x	Denaturierung	+92 °C	30 s
	Annealing	+55 °C	30 s
	Extension	+72 °C	60 s
1x	Extension	+72 °C	180 s

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Reaktionsgefäße bis zur weiteren Verwendung bei +4 °C aufbewahrt.

3.2.2.2 Überprüfung der Spezifität

Zur Überprüfung der Spezifität der neu entwickelten Primer für den Nachweis von *C. bowmanii*, *C. frigoris* und *C. gasigenes* stand jeweils nur ein einziges von der DSMZ bezogenes Isolat zur Verfügung. Es war über die Dauer der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit nicht möglich, weitere Isolate der drei Spezies zu erhalten.

Zur Bestimmung der Spezifität der PCR-Systeme wurden insgesamt 55 Bakterienstämme herangezogen (Tabelle 15). Die Auswahl der verwendeten Keime erfolgte in Anlehnung an Broda et al. (2003a). Zusätzlich wurden weitere psychrophile bzw. psychrotrophe *Clostridium* spp. sowie Fleisch-, bzw. Rind-assoziierte Bakterienarten für die Untersuchungen herangezogen.

25 Isolate standen als lyophilisierte Reinkulturen in Magermilchfläschchen in der Stammsammlung des Max Rubner-Institutes in Kulmbach zur Verfügung. Die übrigen 30 Isolate wurden in gefriergetrocknetem Zustand in Doppelglasampullen von der DSMZ bezogen.

Alle Stämme wurden zunächst in 1,5 ml des jeweils geeigneten flüssigen Nährmediums gelöst und für zwei Stunden resuspendiert. Wärmeempfindliche Keime wurden dabei gekühlt, die übrigen Isolate bei Raumtemperatur belassen (Tabelle 15). Bei allen anaeroben Bakterienarten erfolgten alle Arbeitsschritte in einer anaeroben Arbeitsstation und mit vorreduzierten Nährmedien (Kapitel 3.2.1.1).

Nach dem Resuspendieren wurden die einzelnen Stämme auf einem geeigneten festen Nährmedium subkultiviert, um sie auf Reinheit zu überprüfen.

Nachdem die einzelnen Stämme in Reinkultur vorlagen, wurden von jeder Platte mit einer sterilen Einmalimpföse einige Kolonien abgenommen und in ein mit Phosphat Buffered Saline (PBS) gefülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß verbracht. Die Bakteriensuspension wurde durch Schütteln homogenisiert und im Anschluss mittels Thomakammer ausgezählt. Die Zelldichte der einzelnen Isolate wurde auf $1-9 \times 10^9$ Zellen/ml eingestellt.

Tabelle 15: Herkunft und Anzuchtbedingungen der zur Überprüfung der Spezifität verwendeten Bakterienstämme

Spezies	Stamm- Nummer	Herkunft	Nährmedium und Anzucht
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	AS 1	DSMZ	Standard I (ST I) Bouillon/Agar, +30 °C, 24 h
<i>Bacillus cereus</i>	B 175	MRI	ST I Bouillon/Agar, +30 °C, 48 h
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Mb 24	MRI	ST I Bouillon/Agar, +25 °C, 48 h
<i>Clostridium algidicarnis</i>	C 222	DSMZ	Pepton-Yeast-Glucose-Starch (PYGS) Bouillon/präduzierter Columbia Blut Agar (CBA), +22 °C, 6 d
<i>Clostridium</i> <i>algidixylanolyticum</i>	C 223	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +20 °C, 6 d
<i>Clostridium bowmanii</i>	C 240	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +15 °C, 10 d
<i>Clostridium butyricum</i>	C 224	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 24 h
<i>Clostridium butyricum</i>	C 225	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +30 °C, 3 d
<i>Clostridium carnis</i>	C 226	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 24 h
<i>Clostridium chauvoei</i>	C 227	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 24 h
<i>Clostridium difficile</i>	C 228	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 24 h
<i>Clostridium difficile</i>	C 229	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 24 h
<i>Clostridium estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i>	C 213	MRI	PYGS Bouillon/präred. CBA, +10 °C, 10 d
<i>Clostridium estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i>	C 212	MRI	PYGS Bouillon/präred. CBA, +10 °C, 10 d
<i>Clostridium estertheticum</i> - like	C 194	MRI	PYGS Bouillon/präred. CBA, +10 °C, 10 d
<i>Clostridium frigidicarnis</i>	C 231	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +30 °C, 24 h
<i>Clostridium frigoris</i>	C 241	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +5 °C, 12 d
<i>Clostridium gasigenes</i>	C 239	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +20 °C, 10 d
<i>Clostridium perfringens</i>	C 94	MRI	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 48 h
<i>Clostridium perfringens</i>	C 242	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 48 h
<i>Clostridium putrefaciens</i>	C 232	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 24 h
<i>Clostridium septicum</i>	C 233	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 24 h
<i>Clostridium sporogenes</i>	C 154	MRI	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 48 h
<i>Clostridium subterminale</i>	C 234	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 24 h
<i>Clostridium subterminale</i>	C 235	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 4 d
<i>Clostridium tagluense</i>	C 245	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +15 °C, 10 d
<i>Clostridium tetanomorphum</i>	C 236	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 4 d
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	C 237	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 24 h
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	C 238	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 4 d
<i>Clostridium vincentii</i>	C 221	DSMZ	PYGS Bouillon/präred. CBA, +37 °C, 24 h
<i>Enterobacter aerogenes</i>	En 84	DSMZ	ST I Bouillon/Agar, +30 °C, 24 h

Fortsetzung Tabelle 15

Spezies	Stamm- Nummer	Herkunft	Nährmedium und Anzucht
<i>Enterococcus faecalis</i>	Lb 1225	MRI	Lactobacillus-Bouillon/Agar nach De Man, Rogosa und Sharpe (MRS), +30 °C, 24 h
<i>Escherichia coli</i>	E 9	MRI	ST I Bouillon/Agar, +37 °C, 24 h
<i>Escherichia coli</i>	E 134	MRI	ST I Bouillon/Agar, +37 °C, 24 h
<i>Hafnia alvei</i>	Ha 19	DSMZ	ST I Bouillon/Agar, +30 °C, 24 h
<i>Lactobacillus brevis</i>	Lb 1247	MRI	MRS Bouillon/Agar, +30 °C, 24 h
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Lb 638	MRI	MRS Bouillon/Agar, +30 °C, 24 h
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Lb 1212	MRI	MRS Bouillon/Agar, +30 °C, 24 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	Li 130	MRI	ST I Bouillon/Agar, +37 °C, 48 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	Li 140	MRI	ST I Bouillon/Agar, +37 °C, 48 h
<i>Proteus vulgaris</i>	Pr 19	DSMZ	ST I Bouillon/Agar, +37 °C, 24 h
<i>Proteus vulgaris</i>	Pr 20	DSMZ	ST I Bouillon/Agar, +37 °C, 24 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PS 80	MRI	ST I Bouillon/Agar, +30 °C, 48 h
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PS 88	MRI	ST I Bouillon/Agar, +25 °C, 48 h
<i>Pseudomonas fragi</i>	PS 86	MRI	ST I Bouillon/Agar, +25 °C, 48 h
<i>Pseudomonas lundensis</i>	PS 94	MRI	ST I Bouillon/Agar, +25 °C, 48 h
<i>Pseudomonas putida</i>	PS 89	MRI	ST I Bouillon/Agar, +25 °C, 48 h
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> = <i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i>	S 689	MRI	ST I Bouillon/Agar, +37 °C, 48 h
<i>Serratia marcescens</i>	SM 15	MRI	ST I Bouillon/Agar, +37 °C, 48 h
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Shew 5	DSMZ	ST I Bouillon/Agar, +26 °C, 24 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	St 9	MRI	ST I Bouillon/Mannitol-Salt-Egg-Agar (MSE), +37 °C, 48 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	St 1	MRI	ST I Bouillon/MSE-Agar, +37 °C, 48 h
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>humanus</i>	Str 44	MRI	ST I Bouillon/CBA, +30 °C, 48 h
<i>Weisella viridescens</i>	Lb 1346	DSMZ	MRS Bouillon/Agar, +30 °C, 48 h
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Y 194	DSMZ	Brain Heart Infusion Bouillon/CBA, +30 °C, 24 h

AS: *Aeromonas*; B: *Bacillus*; C: *Clostridium*; CBA: Columbia Blut Agar; d: Tage; DSMZ: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; E: *Escherichia*; EN: *Enterobacter*; h: Stunden; HA: *Hafnia*; Lb: *Lactobacillus*; Li: *Listeria*; Mb: *Microbacterium*; MRI: Max Rubner-Institut; MRS: Lactobacillus-Bouillon/Agar nach De Man, Rogosa und Sharpe; MSE: Mannitol-Salt-Egg-Agar; PS: *Pseudomonas*; PYGS: Pepton-Yeast-Glucose-Starch Bouillon; präd.: präreduziert; S: *Salmonella*; SM: *Serratia*; Shew: *Shewanella*; St: *Staphylococcus*; ST I: Standard I Bouillon/Agar; Str: *Streptococcus*

Für die DNA-Extraktion der 55 Bakterienstämme wurde das High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) verwendet. Um die Menge an extrahierter DNA zu erhöhen, wurde die mitgelieferte Herstelleranleitung zur Isolierung von DNA aus Bakterien und Hefen nach Broda et al. (2003a) und nach Ziegler (2009) modifiziert. Für die DNA-Extraktion der in Tabelle 15 angegebenen Clostridien wurde das modifizierte Protokoll A (Tabelle 16) verwendet, die DNA der übrigen in Tabelle 15 aufgeführten Bakterien wurde mittels modifiziertem Protokoll B (Tabelle 16) extrahiert.

Tabelle 16: Modifizierungen des Herstellerprotokolls des „High Pure PCR Template Preparation Kit“ (Roche) zur Isolierung von DNA aus Bakterien oder Hefen für die verschiedenen Bakteriengruppen

Bakteriengruppe	Protokoll, Modifikationen
	A Herstelleranleitung zur Isolierung von DNA aus Bakterien und Hefen
Gram positive	<u>Modifikationen:</u>
Sporenbildner	1) Vorgeschaltet: mechanische Behandlung der Bakteriensuspensionen in einem Ribolyser Cell Disrupter ⁽¹⁾
	2) Zugabe von 200 µl Lysozym und Inkubation bei 37 °C für 60 min ⁽²⁾
	3) Während des einstündigen Inkubierens alle 20 min kurz schütteln ⁽¹⁾
	4) Elution der DNA in zwei Schritten: Zugabe von 100 µl Elutionspuffer, anschließend Zentrifugation, erneute Zugabe von 100 µl Elutionspuffer mit anschließender Zentrifugation ⁽¹⁾
	B Herstelleranleitung zur Isolierung von DNA aus Bakterien und Hefen
Gram positive und	<u>Modifikation:</u>
Gram negative	Elution der DNA in zwei Schritten: Zugabe von 100 µl Elutionspuffer, anschließend Zentrifugation, erneute Zugabe von 100 µl Elutionspuffer mit anschließender Zentrifugation ⁽¹⁾
Bakterien	
⁽¹⁾ : Ziegler, (2009)	⁽²⁾ : Broda et al., (2003a)

Im Anschluss an die DNA-Extraktion wurde die DNA der 55 Bakterienstämme als Template in die PCR-Systeme von *C. bowmanii*, *C. frigoris* und *C. gasigenes* eingesetzt, um die Spezifität des jeweiligen PCR-Systems zu überprüfen. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde zu jedem Reaktionsgefäß 2 µl Gel-Loading-Puffer zugegeben. Anschließend wurden 10 µl der Reaktionsprodukte auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Danach wurden die PCR-Produkte mittels Elektrophorese für 55 min bei 125 V aufgetrennt (Biometra).

Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und das Ergebnis mittels UV-Transilluminator (Biometra) sichtbar gemacht.

3.2.2.3 Nachweisrate für vegetative Zellen der Clostridien im Fleischtropfsaft

Der Tropfsaft für diese Versuche wurde aus 8,3 kg vakuumverpacktem Rindfleisch aus dem Handel gewonnen. Hierfür wurden zweimal je zwei Fleischstücke von ca. 2 kg mit einem Gewicht von 28 kg beschwert, um den Fleischtropfsaft aus dem Gewebe zu pressen. Anschließend wurde der Tropfsaft von jedem der vier Fleischstücke mittels steriler Pipette aus der Vakuumverpackung abgezogen (insgesamt ca. 1,4 l) und gesondert aufbewahrt.

Der aus den beiden Fleischstücken gewonnene Tropfsaft wurde auf das Vorkommen von *C. bowmanii*, *C. estertheticum*, *C. frigoris* und *C. gasigenes* überprüft. Dazu wurde jeweils 1 ml Tropfsaft mittels DNA-Extraktion und PCR (Kapitel 3.2.2.1 und Broda et al., 2003a) direkt auf eine natürliche Kontamination mit oben genannten Clostridienspezies untersucht, sowie 1 ml Tropfsaft je Fleischstück in 9 ml präreduzierte PYGS-Bouillon überführt, 21 Tage bei 10 °C angereichert und mittels PCR (Kapitel 3.2.2.1 und Broda et al., 2003a) auf das Vorhandensein von *C. bowmanii*, *C. estertheticum*, *C. frigoris* und *C. gasigenes* überprüft.

Bei Vorliegen negativer PCR-Ergebnisse wurde der Tropfsaft für den Inokulationsversuch verwendet. Bis zur Verwendung wurde der Tropfsaft zu 4,5 ml-Portionen aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Bei der Ermittlung der Nachweisrate für vegetative Zellen von *C. bowmanii*, *C. frigoris* und *C. gasigenes* wurde analog zu Ziegler (2009) verfahren. Dafür wurde von jedem Referenzstamm (DSMZ) zunächst eine 96 Stunden-Kultur angefertigt und die Keimzahl der einzelnen Kulturen durch Auszählen in der Zählkammer nach Thoma bestimmt (Tabellen 31, 32 und 33).

Zur Inokulation von Fleischtropfsaft wurden von jedem Referenzstamm dezimale Verdünnungsreihen in PBS hergestellt. Jede einzelne Verdünnungsstufe wurde dann um eine weitere Zehnerpotenz verdünnt, indem jeweils 0,5 ml Bakteriensuspension in 4,5 ml Fleischtropfsaft überführt wurden.

Aus dem beimpften Tropfsaft wurde jeweils 1 ml entnommen und eine DNA-Extraktion für Gram positive Sporenbildner (Protokoll A, Tabelle 16) durchgeführt. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurde dieser Versuchsansatz pro PCR-System dreimal wiederholt.

Die extrahierte DNA wurde anschließend dem jeweiligen Mastermix zugesetzt, der zuvor nach dem entsprechenden PCR-Protokoll pipettiert wurde. Es folgte die Amplifikation der DNA im Thermocycler. Die PCR-Produkte wurden zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Ergebnisse visuell ausgewertet.

Zur Etablierung des Experion Automated Electrophoresis System (Biorad) am Max Rubner Institut Kulmbach wurde dessen Einsatz für den Nachweis von psychrotoleranten Clostridien parallel getestet. Es wurde untersucht, ob sich bei Einsatz der Gelelektrophorese zum Nachweis von PCR-Produkten andere Nachweisgrenzen ergeben, als bei Einsatz des Experion Gerätes. Dafür wurden die Polymerasekettenreaktionen noch einmal durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey und Nagel) laut Herstelleranleitung zum PCR Clean-Up aufgereinigt und in das Experion Automated Electrophoresis System (Biorad) eingesetzt.

Dabei wurde ein kommerzieller DNA-Chip, der mit einem Netzwerk von Mikrokanälen versehen war, mit einer Fluoreszenzfarbstoff-versetzten Gelmatrix beladen.

Nach dem Pipettieren von Ladepuffer und Marker in die dafür auf dem Chip vorgesehenen Vertiefungen wurde das DNA-Template (1µl aufbereitetes Probenmaterial) in die jeweiligen Vertiefungen hinzugefügt.

Der Mikrochip wurde nun in die Experion Elektrophorese Station eingesetzt. Das Anlegen von Spannung erfolgte durch das Eintauchen der Elektroden in die einzelnen Kavitäten des Chips. Die DNA-Moleküle wanderten auf Grund der elektrophoretischen Bewegung unter Auftrennung der Probenkomponenten durch die Gelmatrix (Biorad Bulletin 10006453; Konrad und Busch, 2010). Dabei liefen die DNA-Moleküle an einem Fluoreszenzdetektor vorbei, der die Daten der Fluoreszenz und die Zeit der Wanderung an die Software übermittelte. Die Software wandelte die übermittelten Daten in ein virtuelles Gelbild und ein Elektroferrogramm um (Chang et al., 2010).

Die Ergebnisse der konventionellen Gelelektrophorese und des Experion Automated Electrophoresis System wurden verglichen. Abbildung 6 zeigt schematisch das Vorgehen zur Ermittlung der Nachweisgrenze für vegetative Zellen von psychrotoleranten *Clostridium* spp. in Fleischtropfsaft.

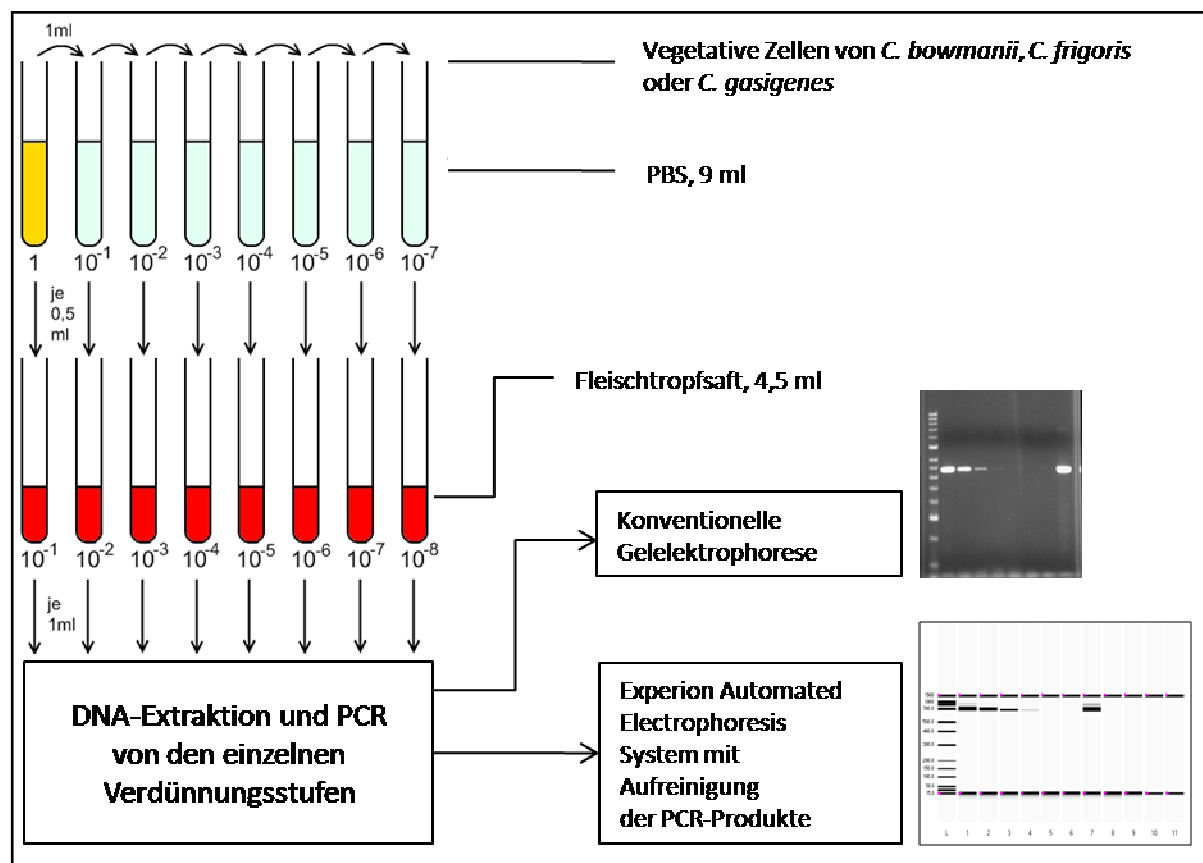


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Ermittlung der Nachweisrate von psychrotoleranten *Clostridium* spp. in Tropfsaft von Rindfleischproben

Für den Ausschluss falsch negativer PCR-Ergebnisse durch inhibitorische Substanzen wurde bei jeder Verdünnungsstufe eine externe Amplifikationskontrollreaktion durchgeführt (Ziegler, 2009). Der PCR-Mix für die Amplifikationskontrolle wurde entsprechend den Angaben in Tabelle 17 hergestellt.

Tabelle 17: Pipettierschema der eingesetzten Amplifikationskontroll-PCR zur Überprüfung auf inhibitorische Substanzen im Probenmaterial

Reagenz	Menge pro Ansatz [µl]	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz
10 x Reaktionspuffer S	3,13	10 x	1,25 x
Primer HB10	0,1	0,1 nm/µl	1 µM
Primer HB11	0,1	0,1 nm/µl	1 µM
dNTP-Mix	0,5	10 mM	200 µM
Taq-Polymerase	0,2	5 U/µl	1 U/µl
pUC 19 DNA	1		
A. bidest. steril	18,97		
Aufbereitete Proben-DNA	1		

Die anschließende Amplifikation im Thermocycler erfolgte nach dem in Tabelle 18 beschriebenen Programm.

Tabelle 18: Bedingungen für die externe Amplifikationskontroll-PCR

Anzahl	Schritt	Temperatur	Dauer
1x	Initiale Denaturierung	+95 °C	5 min
30x	Denaturierung	+95 °C	30 s
	Annealing	+65 °C	30 s
	Extension	+72 °C	1 min
1x	Extension	+72 °C	7 min

Es folgte die elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid. Waren in der aufbereiteten DNA keine PCR-Inhibitoren vorhanden, so entstand ein PCR-Produkt mit einer Länge von 429 bp.

3.2.2.4 Nachweisrate für Sporen der Clostridien im Fleischtropfsaft

Die Nachweisgrenze der PCR-Verfahren für Sporen von *C. bowmanii*, *C. frigidus* und *C. gasigenes* wurde ebenfalls in Anlehnung an Ziegler (2009) bestimmt. Als Ausgangsmaterial für die Verdünnungsreihe diente eine gereinigte Sporensuspension.

Die Sporensuspensionen für *C. frigidus* und *C. gasigenes* wurden nach Ziegler (2009) in Anlehnung an die Methode von Peck et al. (1992) hergestellt. Die Inkubation erfolgte abweichend von Peck et al. (1992) für *C. frigidus* über ein Jahr bei +5 °C und für *C. gasigenes* über ein Jahr bei +20 °C.

Für die Herstellung einer Sporensuspension von *C. bowmanii* wurden das Sporulation Medium nach Peck et al. (1992) sowie das DSMZ Medium 63 mit den Modifikationen nach Spring et al. (2003) verwendet und nach 16 Wochen auf das Vorhandensein von Sporen untersucht.

Das weitere Vorgehen zur Bestimmung der Nachweisgrenze entsprach dem in Kapitel 3.2.2.3 beschriebenen.

Die PCR-Produkte wurden abweichend von Kapitel 3.2.2.3 vor der Analyse mittels Experion Automated Electrophoresis System nicht mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey und Nagel) aufgereinigt.

3.2.3 Psychrotolerante *Clostridium* spp. in fleischverarbeitenden Betrieben

3.2.3.1 Inokulationsversuche – Etablierung der Methode

Es wurde die Nachweisbarkeit von *C. estertheticum*-Sporen von Kunststoff- und Edelstahloberflächen mittels Wattetupfer überprüft.

Herstellung der Inokulationssuspension

Zum Herstellen der Sporensuspension für die Inokulation wurden jeweils 9 ml PYGS-Bouillon mit Kolonien des DSMZ-Stammes 8809 von *C. estertheticum* beimpft und bis zum Vorliegen einer fast vollständig versporteten Kultur zehn Monate bei +10 °C inkubiert. Nach Ermittlung der Sporenanzahl in der Zählkammer nach Thoma wurde die Sporensuspension mit 0,85 %iger NaCl-Lösung auf eine Konzentration von etwa 5×10^7 Sporen/ml verdünnt.

Die Sporensuspension wurde vor der Inokulation der verschiedenen Oberflächen zur Simulation einer verschmutzten eiweißreichen Oberfläche mit gleichen Teilen sterilem Rinderserum (ACILA) versetzt. Abbildung 7 zeigt das Verdünnungsschema bis zur endgültigen Inokulationskonzentration der Plättchen von etwa 10^4 KbE/cm².

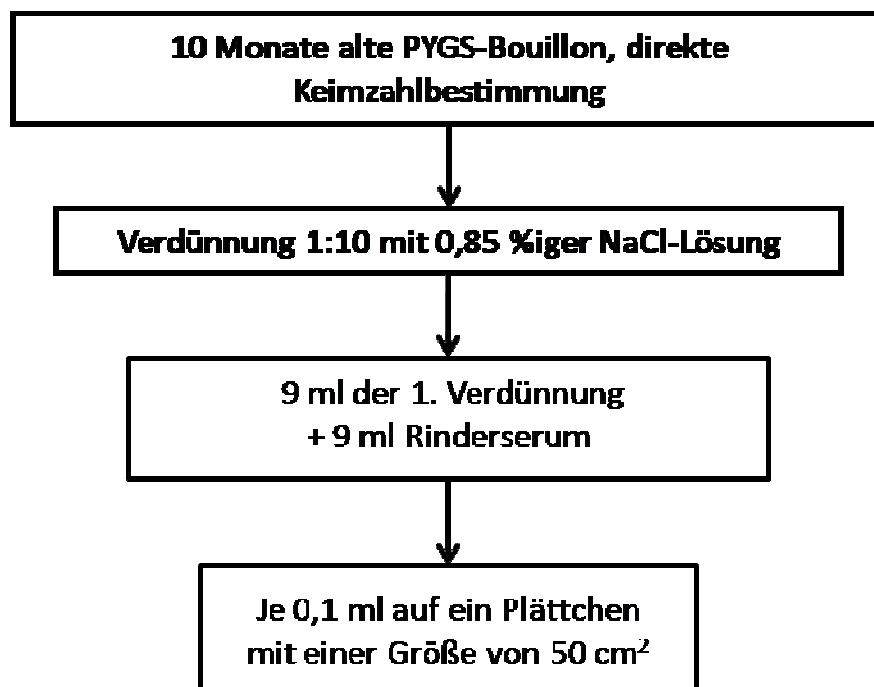


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Herstellung der Testsuspensionen für die Inokulation verschiedener Oberflächen mit *C. estertheticum*

Versuchsanordnung

Es wurden zwei unterschiedliche, häufig in Schlacht- und Zerlegebetrieben eingesetzte Oberflächenmaterialien überprüft: Edelstahlplatten und handelsübliche Schneidbretter aus Polyethylen. Aus beiden Materialien wurden quadratische Plättchen mit einer Oberfläche von 50 cm² hergestellt.

Bei den Plättchen aus Polyethylen wurden zwei verschiedene Materialbeschaffenheiten erzeugt. Ein Teil der Plättchen wurde im Originalzustand belassen, bei den anderen Kunststoffplättchen wurde die Oberfläche eingeritzt. Damit sollte bei den Polyethylenplatten ein neuer bzw. gebrauchter Zustand simuliert werden.

Jede Oberfläche wurde mit 0,1 ml der vorher hergestellten Sporensuspension inokuliert, indem die Flüssigkeit mit einem Drigalski Spatel auf dem jeweiligen Plättchen gleichmäßig verteilt wurde.

Anschließend wurden die Plättchen zur Trocknung 20 Minuten bei Raumtemperatur (+24 °C) belassen und jedes Plättchen nach einem definierten Muster mit einem sterilen, mit PYGS-Bouillon angefeuchteten Holzwattetupfer (Neolab) abgefahren. Unter leichter Drehung des Tupfers wurden jeweils zehn Tupferstriche über die gesamte Plättchenfläche gezogen, anschließend das Plättchen um 90 ° gedreht und zehn weitere Tupferstriche vorgenommen. Mit einem zweiten, unbefeuchteten Tupfer wurde die Fläche in gleicher Weise nochmals beprobt.

Die drei unterschiedlichen Oberflächen wurden jeweils im Doppelansatz inokuliert und bei jedem Versuchsansatz je überprüftem Oberflächenmaterial eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Negativkontrollen wurden mit 0,1 ml eines sterilen Kochsalzlösung-Rinderserumgemisches (Verhältnis 1:1) versehen. Dieser Versuchsansatz wurde dreimal wiederholt.

Beide Holzwattetupfer wurden zusammen in ein Röhrchen mit 9 ml PYGS-Bouillon verbracht und im Anschluss wurden die Bakteriensporen durch Schütteln der PYGS-Röhrchen (1 min) von den Wattetupfern resuspendiert.

Nach anaerober Inkubation der Röhrchen für 21 Tage bei +4 °C erfolgte die DNA-Isolierung mittels High Pure PCR Template Preparation Kit nach Herstellerprotokoll zur Isolierung von DNA aus Bakterien und Hefen, aber mit den unter Tabelle 16 (Kapitel 3.2.2.2) angegebenen Modifikationen für Gram positive Sporenbildner (Protokoll A). Die isolierte DNA wurde anschließend mittels den Primerpaaren 16SEF/16SER und EISRF/EISRR nach Broda et al. (2003a) amplifiziert.

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Amplifikate mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels UV-Transilluminator sichtbar gemacht (Kapitel 3.2.2.2). Die PCR-Reaktion war bei Anwendung des 16SEF/16SER-Primersets positiv, wenn eine Bande mit einer Größe von 790 bp erschien. Ein positives Ergebnis bei Anwendung des EISRF/EISRR-Primersets lag vor, wenn eine Bande mit einer Größe von 235 bp erschien.

3.2.3.2 Probenahme in fleischverarbeitenden Betrieben

Mittels steriler Holz wattetupfer (Neolab) wurden Oberflächenproben im Zerlege- oder Kühllagerbereich bei drei fleischverarbeitenden Betrieben genommen (Kapitel 3.1.2). In jedem dieser Betriebe waren bereits Fälle von Blown Pack Spoilage bei vakuumverpacktem Rindfleisch aufgetreten. Bei der Probenahme wurden die Holz wattetupfer zunächst mit steriler PYGS-Bouillon angefeuchtet, anschließend wurden die Tupfer zehnmal mit leicht drehenden Bewegungen des Holz wattetupfers über die zu beprobende Stelle gestrichen. Danach wurden die Holz wattetupfer jeweils in ein Reagenzröhrchen verbracht, das mit 9 ml steriler PYGS-Bouillon gefüllt war. Die Reagenzröhrchen mit den Tupferproben wurden in einer verschlossenen Kühlbox auf Eis gelagert, in das Laboratorium transportiert und dort bis zur weiteren Untersuchung bei +4 °C gelagert.

Durch Schütteln der PYGS-Röhrchen (1 min) wurde das vorhandene Probenmaterial von den Wattetupfern gelöst. Im Anschluss wurden die Röhrchen für 21 Tage bei +4 °C anaerob inkubiert. Die Holz wattetupfer verblieben in den Reagenzröhrchen. Für die DNA-Extraktion aus den Tupferproben wurde das High Pure PCR Template Preparation Kit verwendet (Protokoll A, Tabelle 16).

Nach der DNA-Extraktion aus den angereicherten Tupferproben wurde die Proben-DNA mit den verschiedenen PCR-Systemen untersucht. Der Nachweis von *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Organismen wurde nach Broda et al. (2003a) mit den Primerpaaren 16SEF/16SER und EISRF/EISRR durchgeführt. Der PCR-Nachweis von *C. bowmanii* und *C. frigidus* wurde jeweils mit dem unter 3.2.2.1 beschriebenen PCR-System durchgeführt, jedoch nur bei den Proben, die zuvor eine Bande auf Höhe des Primerpaares 16SEF/16SER zum Nachweis von *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Organismen erzeugt hatten (Kapitel 3.2.2.1). Der Nachweis von *C. gaeumannii* wurde mit dem unter 3.2.2.1 beschriebenen PCR-System durchgeführt.

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde zu jedem Reaktionsgefäß 2 µl Gel-Loading-Puffer zugegeben. Anschließend wurden 10 µl der Reaktionsprodukte auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Danach wurden die PCR-Produkte mittels Elektrophorese für 55 min bei 125 V aufgetrennt.

Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und das Ergebnis mittels UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

3.2.3.3 Betrieb A

3.2.3.3.1 Ausgangssituation

Es handelte sich um einen deutschen Handwerksbetrieb mit eigener Schlachtung. Die Produkte aus überwiegend eigener Herstellung wurden im angeschlossenen Ladenraum verkauft.

Es wurden ein bis zwei Rinder pro Woche geschlachtet. Die Tiere stammten dabei von drei unterschiedlichen deutschen Zulieferern. Neben Rindern wurden in dem Betrieb auch Schweine geschlachtet, jedoch zeitlich voneinander getrennt.

Die Enthäutung der Rinder erfolgte per Hand, ein Teil des Rindfleischs wurde vakuumverpackt, der andere Teil in regional üblichen Polyethylenfässern gereift.

In beiden Lagerungssystemen kam es bereits nach 3-4 Wochen unabhängig von der Herkunft der Rinder zu einer deutlichen Verderbssymptomatik.

Die Schlacht- und Zerlegeräume wurden täglich mit einem Dampfstrahler bei einer Temperatur von +50 °C gereinigt. Einmal in der Woche erfolgte eine Schaumreinigung. Diese wurde im zweiwöchigen Wechsel jeweils mit einem alkalischen Schaumreiniger mit Aktivchlor bzw. einem sauren Schaumreiniger durchgeführt. Arbeitsmaschinen und -gegenstände wurden täglich oder nach Bedarf zusätzlich mit einem neutralen Reinigungskonzentrat gesäubert, anschließend erfolgte das Nachspülen mit Trinkwasser.

Probenahme

Der Betrieb wurde insgesamt vier Mal beprobt. Zwischen den Probenahmen erfolgten unterschiedliche Maßnahmen, wie sie in Kapitel 3.2.3.3.2 beschrieben wurden.

Die Probenahmestellen waren dabei stets identisch (Abbildung 8). Die Durchführung der Tupferprobenahme sowie die weitere Bearbeitung der Tupferproben erfolgten wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben.

Abbildung 8 zeigt einen Übersichtsplan des untersuchten Betriebes. Die mit Nummern 1-10 gekennzeichneten Punkte stellen die beprobten Flächen dar. Jede Stelle wurde im Doppelansatz untersucht.



Nummer	Ort
1	Boden im Fleischkühlraum, direkt unter abhängendem Rindfleisch
2	Boden im Fleischkühlraum, Eckbereich
3	Zerlegetisch
4	Knochensäge direkt über Zerlegetisch hängend
5	Bandsäge
6	Zerlegebrett
7	Stechschürze
8	Stechhandschuh
9	Tropfsaft vom Rind aus der Fassreifung
10	Tropfsaft vom Schwein aus der Fasslagerung

Abbildung 8: Grundriss von Betrieb A mit gekennzeichneten Probenahmestellen

3.2.3.3.2 Maßnahmen in Betrieb A

Nach der Ermittlung des Grades der Verunreinigung des Betriebes mit psychrotoleranten Clostridien bei der ersten Beprobung im Juli 2009 wurde das Reinigungsmanagement des Betriebes um ein peressigsäurehaltiges Desinfektionsmittel (Antisept 33) erweitert.

Nach Herstellerangaben hatte dieses Mittel eine sporozide Wirkung und eine Peressigsäurekonzentration von 15 %. Das Desinfektionsmittel wurde fortan von den betriebseigenen Mitarbeitern jede zweite Woche zur Betriebsdesinfektion eingesetzt.

Die zweite Beprobung erfolgte im Dezember 2009, nachdem das Mittel etwa vier Monate im Einsatz war. Die dritte Beprobung fand im März 2010 statt. Zwischen der zweiten und dritten Probenahme erfolgten keine zusätzlichen Maßnahmen.

Im Juni 2010 wurde in dem Betrieb eine Grundsanierung durch eine externe Reinigungsfirma durchgeführt.

Im Anschluss an die Komplettreinigung erfolgte die vierte Probenahme im Juni 2010 als Erfolgskontrolle. In den Wochen vor der Grundsanierung wurde die Produktion in dem Betrieb zurückgefahren und die Ware weitgehend abverkauft. Alle Lebensmittel, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht verkauft waren, wurden in externen Fleischkühlanhängern untergebracht.

Anschließend wurden sämtliche Räumlichkeiten und Maschinen des Schlacht- und Zerlegebereiches einer Komplettreinigung mit einem alkalischen Schaumreiniger mit Aktivchlor unterzogen. Bewegliche Objekte wurden entweder in die Reinigungsmaßnahmen einbezogen oder entsorgt. Der Schaumreiniger wurde in einer 3 %igen Konzentration mit einer Einwirkzeit von 20 min verwendet.

Anschließend wurde das Reinigungsmittel mit einem Dampfstrahler bei niedrigem Druck abgespült und eine Desinfektion mit 0,8 %igem Wofasteril® E 400 (KeslaPharma Wolfen GmbH) für eine Stunde durchgeführt. Danach wurde das Desinfektionsmittel mit einem Wasserdampfstrahler bei niedrigem Druck abgespült.

Die Grundsanierung erfolgte an zwei Tagen im Abstand von einer Woche. Zunächst wurden sämtliche Kühlräume sowie Schlacht- und Zerlegeraum saniert.

In der darauffolgenden Woche erfolgte die Grundreinigung des sich anschließenden Verkaufsraumes sowie der Küche und eines kleineren Kühlraumes für Wurstwaren. Die zeitliche Trennung war nötig, damit die Waren aus dem Kühlanhänger abverkauft werden und die finanziellen Verluste des Betriebes gering gehalten werden konnten.

Dabei durften die Waren zur Vermeidung erneuter Kontaminationen aus den Kühlanhängern nicht mehr in den bereits sanierten Bereich des Betriebs gelangen.

3.2.3.4 Betrieb B

3.2.3.4.1 Ausgangssituation

Es handelte sich um einen deutschen Handwerksbetrieb ohne eigene Schlachtung mit mehreren Filialen. Neben Rindfleisch wurde in dem Betrieb Schweine- und Wildfleisch verarbeitet.

Anfang 2009 kam es zu ersten Problemen mit Blown Pack Spoilage bei vakuumverpacktem Rindfleisch. In einigen Fällen wurde bereits nach 2-3 Wochen Lagerungszeit ein Aufgasen der Verpackungen beobachtet.

Der Betrieb hatte mehrere Zulieferer und bezog Rindfleisch von deutschen Rindern aus Intensiv- und Extensivhaltung. Die Verderbssymptomatik trat unabhängig von der Herkunft des Rindfleischs auf.

In dem Betrieb erfolgte täglich eine allgemeine Betriebsreinigung inklusive der Maschinen. Die Vorreinigung wurde mit einem Dampfstrahler im Niederdruckverfahren mit einer Temperatur von ca. +55 °C durchgeführt.

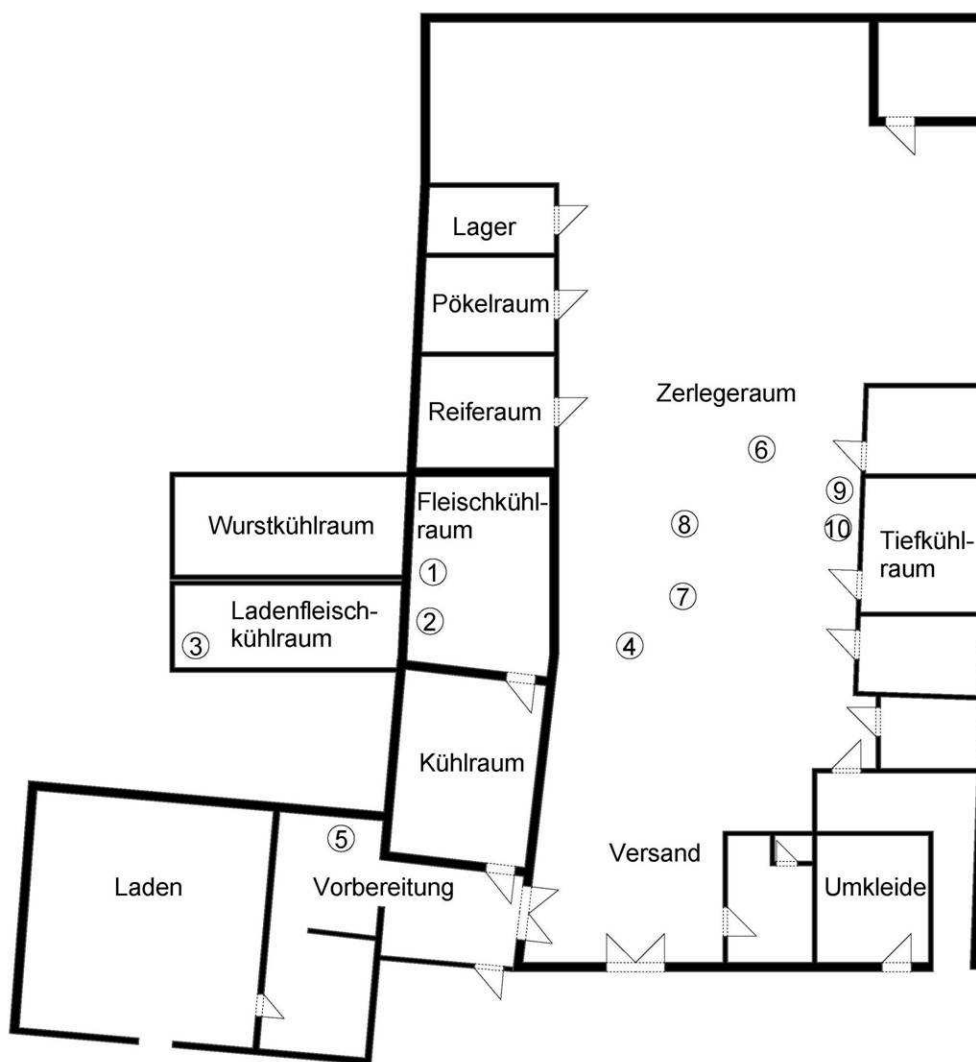
Anschließend wurde ein alkalischer Schaumreiniger mit Aktivchlor verwendet. Außerdem erfolgte einmal pro Woche eine Flächendesinfektion mit einem neutralen Desinfektionsmittel auf Basis quartärer Ammoniumverbindungen, sowie alle 2-3 Wochen eine Entkalkung der Flächen und Maschinen mit einem sauren Schaumreiniger. Nach Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen erfolgte jeweils das Nachspülen mit Trinkwasser.

Probenahme

Der Betrieb wurde zwei Mal beprobt. Zwischen den beiden Probenahmen erfolgten Maßnahmen, wie in Kapitel 3.2.3.4.2 beschrieben. Die Beprobungsorte waren bei jeder Entnahme identisch.

Die Durchführung der Beprobung und die weitere Bearbeitung der Tupferproben entsprach der unter Kapitel 3.2.3.2 beschriebenen Vorgehensweise. Abbildung 9 zeigt einen Übersichtsplan von Betrieb B.

Die mit Nummern 1-10 gekennzeichneten Punkte stellen die beprobten Flächen dar. Jede Stelle wurde doppelt beprobt.



Nummer	Ort
1	Boden im Fleischkühlraum, direkt unter abhängendem Rindfleisch
2	Weiße Fleischkiste, gefüllt mit frischem unverpacktem Rindfleisch
3	Rote Fleischkiste gefüllt mit Knochenware/vakuumverpacktem Rindfleisch
4	Gullyrinne im Zerlegeraum
5	Edelstahl Tisch zur Vorbereitung der Vakuumierung
6	Zerlegetisch
7	Gully Zerlegeraum
8	Lüftung Zerlegeraum
9	Stechschürze
10	Wischblatt des Bodenreinigungsgerätes

Abbildung 9: Grundriss von Betrieb B mit gekennzeichneten Probenahmestellen

3.2.3.4.2 Maßnahmen in Betrieb B

Der Betrieb wurde zwei Mal zu unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt. Die erste Beprobung zur Ermittlung des Ausgangsstatus der Belastung mit psychrotoleranten *Clostridium* spp. erfolgte im August 2009.

Die zweite Probenahme erfolgte im April 2010. Davor wurde das Desinfektionsmittel Wofasteril® E 400 (KeslaPharma Wolfen GmbH) über mehrere Wochen in das Hygienemanagement des Betriebes eingebunden.

3.2.3.5 Betrieb C

3.2.3.5.1 Ausgangssituation

Es handelte sich um einen außerhalb Deutschlands gelegenen europäischen Schlacht- und Zerlegebetrieb mit einem Schlachtvolumen von ungefähr 55.000 Rindern pro Jahr. In dem Betrieb wurden ausschließlich Rinder geschlachtet und verarbeitet.

Vorberichtlich trat in diesem Betrieb erstmals Ende des Jahres 2008 eine Blown Pack-Verderbssymptomatik bei vakuumverpacktem Rindfleisch auf. Bereits im Mai 2009 kam etwa 50 Prozent der ausgelieferten Vakuumware wegen Gasbildung im Vakuum retour. Zum Teil kam es bereits nach 28 Tagen Lagerungsdauer zum Aufgasen der Verpackungen.

Die geschlachteten Rinder stammten vorwiegend aus Intensiv- und Extensivhaltungen aus der näheren Umgebung des Betriebes. Blown Pack Spoilage trat nach Information des Betreibers bei Fleisch von Rindern jeglicher Herkunft und Haltungsform auf.

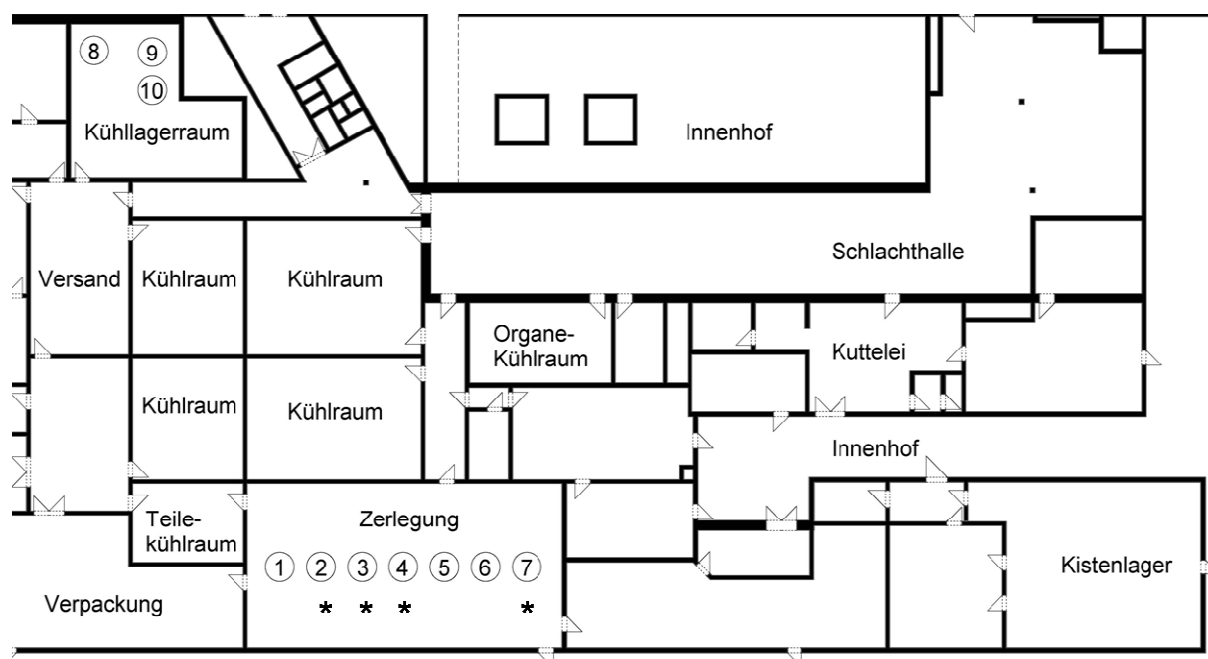
In dem Betrieb erfolgte im Bereich der Schlachtung und Zerlegung täglich eine grobe Vorreinigung mit Wasser. Danach wurde täglich ein Schaumreiniger angewendet: An vier Tagen der Woche wurde ein alkalischer Reiniger mit Aktivchlor und einmal pro Woche ein saurer Schaumreiniger eingesetzt. Nach der Reinigung wurden täglich alle Flächen und Maschinen mit einem schwach alkalischen Desinfektionsmittel mit Aktivchlor eingesprüht und anschließend mit Trinkwasser nachgespült.

Probenahme

Der Betrieb wurde zweimal beprobt. Zwischen den beiden Probenahmen erfolgten Maßnahmen, wie in Kapitel 3.2.3.5.2 beschrieben.

Bei der zweiten Beprobung konnten auf Grund mangelnder Kooperationsbereitschaft des Betriebes nur an sechs von zehn Stellen im Betrieb Proben genommen werden. Die Durchführung der Beprobung sowie die weitere Bearbeitung der Tupferproben erfolgte entsprechend der Beschreibung unter Kapitel 3.2.3.2.

Abbildung 10 zeigt einen Übersichtsplan der untersuchten Firma. Die mit Nummern 1-10 gekennzeichneten Punkte stellen die beprobten Flächen dar, jede Entnahmestelle wurde doppelt untersucht.



Nummer	Ort
1	Oberfläche Zerlegeband
2*	Fünf Glieder des Zerlegebandes
3*	Verbindungsgestänge des Zerlegebandes
4*	Führungsrolle des Zerlegebandes
5	Eisengestänge über dem Zerlegeband
6	Zerlegebrett
7*	Stoffhandschuh von Zerlegepersonal
8	Boden im Kühlageraum, Randbereich
9	Metallverkleidung der Wand im Kühlageraum
10	Gully im Kühlageraum

Abbildung 10: Grundriss von Betrieb C mit gekennzeichneten Probenahmestellen

* : Diese Stellen konnten nur einmal beprobt werden

3.2.3.5.2 Maßnahmen in Betrieb C

Der Betrieb wurde zwei Mal zu unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt.

Die erste Beprobung zur Ermittlung der Belastung des Betriebes mit psychrotoleranten Clostridien erfolgte im Juli 2009. Zu diesem Zeitpunkt war die Firma bereits durch einen externen Fachmann auf ihren allgemeinen Reinigungszustand überprüft worden. Daraufhin wurde auf Anraten des hausinternen Qualitätsmanagements eine Desinfektion mit Aktivchlor durchgeführt und sämtliche Mitarbeiter auf *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und enterohämorrhagische *E. coli* untersucht, um das Auftreten von Ausscheidern von Infektionserregern unter dem Personal auszuschließen.

Die weiteren Maßnahmen zur Verbesserung der Betriebshygiene wurden ebenfalls eigenständig durch das Qualitätsmanagement beschlossen und durchgeführt. Es erfolgte eine Erhöhung der Konzentrationen der eingesetzten Reinigungs- und Desinfektionsmittel.

Zur Desinfektion wurde zusätzlich ein Produkt auf Basis einer quartären Ammoniumverbindung eingesetzt. Außerdem wurde der Schlacht- und Zerlegebereich mit einem kationischen Polymer aus der Gruppe der Guanidine vernebelt (Akafog[®], Aka-Technology GmbH). Kühlräume sowie Kühlagerräume waren von der Vernebelung ausgeschlossen.

Die zweite Beprobung des Betriebes erfolgte im September 2009.

4 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt sechs psychrotolerante Clostridien phänotypisch näher untersucht und die Ergebnisse mit bereits bestehenden Studien verglichen.

Es wurden zwei PCR-Systeme zum Nachweis von *Clostridium bowmanii* und *C. frigidis* entwickelt. Der Nachweis von *C. gasigenes* (Broda et al., 2003a) wurde durch die Entwicklung eines neuen Primers optimiert. Darüber hinaus wurden die konventionelle Gelelektrophorese und das Experion Automated Electrophoresis System miteinander verglichen.

Durch Inokulationsversuche wurde die Nachweisbarkeit von *C. estertheticum*-Sporen mittels PCR nach Broda et al. (2003a) und Wattetupfern von verschiedenen Oberflächen überprüft.

Im Anschluss wurden Oberflächenproben von drei fleischverarbeitenden Betrieben genommen und jeweils vor und nach unterschiedlichen Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen auf das Vorhandensein psychrotoleranter Clostridien untersucht.

4.1 Vergleich psychrotoleranter *Clostridium* spp.

4.1.1 *C. bowmanii*

Das Bakterium zeigte nach einer Inkubation von sieben Tagen bei +15 °C unter anaeroben Bedingungen bereits beginnendes Koloniewachstum auf CBA. Nach 20 Tagen waren die einzelnen Kolonien rund und leicht erhaben, die Oberfläche sowie die Ränder erschienen grob gekörnt. Der Durchmesser der Kolonien betrug 1-2 mm. Die Kolonien waren im inneren Bereich von weißgrauer Farbe und opak, im äußeren Bereich grau und durchscheinend (Abbildung 11). Auf CBA zeigten die Keime keine Hämolyse. Im Phasenkontrastmikroskop waren die vegetativen Zellen als schlanke Stäbchen erkennbar. Die Größe variierte im Bereich zwischen 0,8-1,2 µm x 3-9 µm. Im Rasterelektronenmikroskop stellten sich die Keime als schlanke Stäbchen mit gleichmäßigem Durchmesser dar, wobei sich die Endosporen in terminaler Position befanden (Abbildung 11).

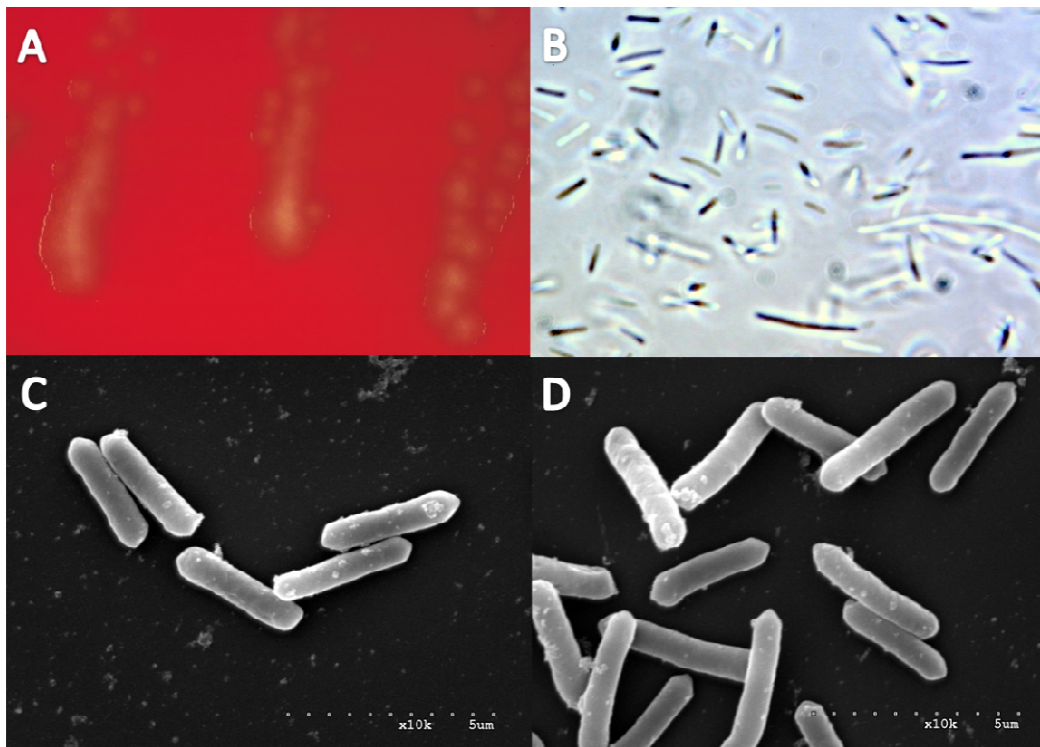


Abbildung 11: Reinkultur von *C. bowmanii* (DSMZ 14206) auf CBA (20 Tage, +15 °C, anaerob) [A], im Phasenkontrastmikroskop bei 1000 facher Vergrößerung [B] und im Rasterelektronenmikroskop bei 10.000 facher Vergrößerung [C + D]

4.1.2 *C. estertheticum* subsp. *estertheticum*

Nach einer Inkubation von neun Tagen bei +10 °C unter anaeroben Bedingungen entstanden makroskopisch sichtbare Kolonien auf CBA. Nach 20 Tagen waren die einzelnen Kolonien rund und leicht erhaben, die Ränder der Kolonien waren zum Teil gewellt. Der Durchmesser der Kolonien betrug 1-2 mm. Die Kolonien waren im Zentrum grau und undurchsichtig, im äußeren Bereich grauweiß und durchscheinend. Nach elf Tagen zeigten sie deutliche β -Hämolyse auf CBA (Abbildung 12). Im Phasenkontrastmikroskop waren die vegetativen Zellen als plumpe Stäbchen erkennbar. Ihre Größe betrug zwischen 0,8-1,9 x 2,7-10 μm . Die vegetativen Zellen stellten sich im Rasterelektronenmikroskop als keulenförmige Stäbchen dar, die Endosporen befanden sich in terminaler oder zentraler bis subterminaler Position (Abbildung 12).

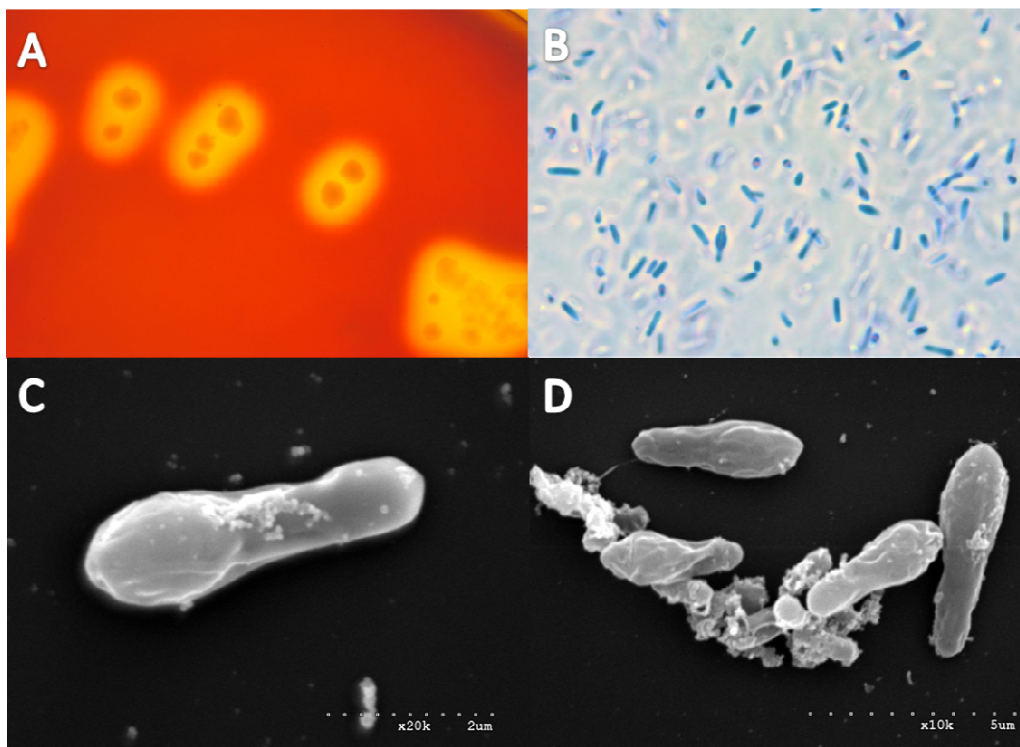


Abbildung 12: Reinkultur von *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* (DSMZ 8809) auf CBA (20 Tage, +10 °C, anaerob) [A], im Phasenkontrastmikroskop bei 1000 facher Vergrößerung [B] und im Rasterelektronenmikroskop bei 20.000 facher [C] bzw. 10.000 facher [D] Vergrößerung

4.1.3 *C. estertheticum* subsp. *laramiense*

Nach einer Inkubation von elf Tagen bei +10 °C unter anaeroben Bedingungen entstanden makroskopisch sichtbare Kolonien auf CBA. Die einzelnen Kolonien waren rund und leicht erhaben, die Ränder der Kolonien waren zum Teil unregelmäßig. Der Durchmesser der Kolonien betrug 1-3 mm. Die Kolonien waren im Zentrum grau und undurchsichtig, im äußeren Bereich weißgrau und durchscheinend. Nach 13 Tagen zeigten sie deutliche β -Hämolyse auf CBA (Abbildung 13). Im Phasenkontrastmikroskop waren die vegetativen Zellen als plumpe Stäbchen erkennbar. Die Größe lag zwischen 0,8-1,5 x 2,7-9,2 μ m. Im Rasterelektronenmikroskop stellten sich die vegetativen Zellen als keulenförmige Stäbchen dar, die Endosporen befanden sich in terminaler, subterminaler oder zentraler Position (Abbildung 13).

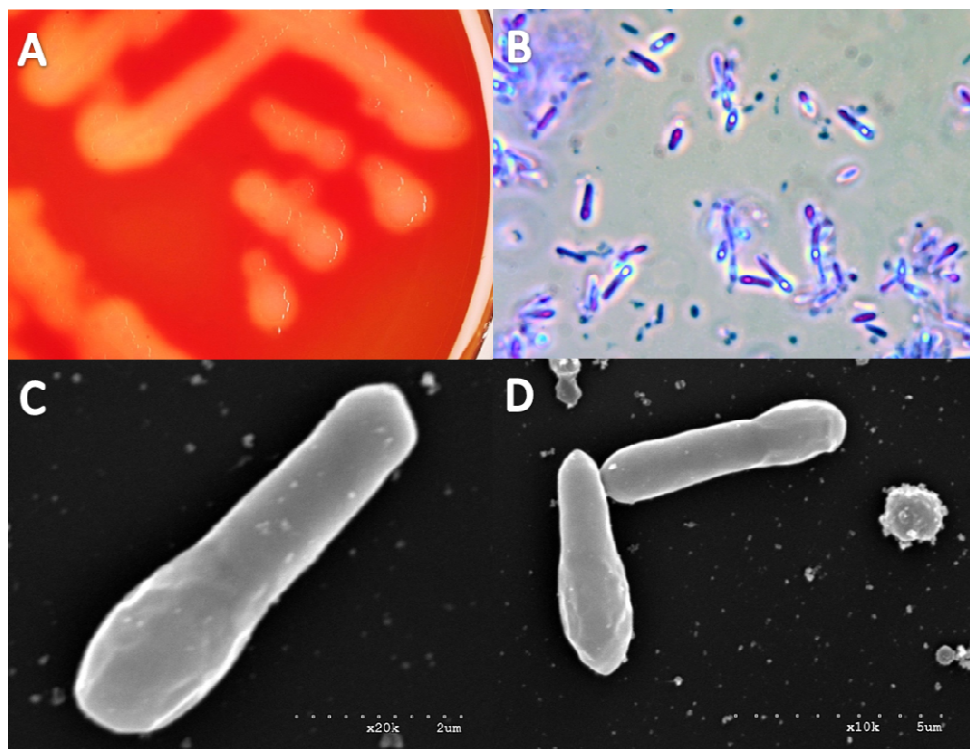


Abbildung 13: Reinkultur von *C. estertheticum* subsp. *laramiense* (DSMZ 14864) auf CBA (28 Tage, +10 °C, anaerob) [A], im Phasenkontrastmikroskop bei 1000 facher Vergrößerung [B] und im Rasterelektronenmikroskop bei 20.000 facher [C] bzw. 10.000 facher Vergrößerung [D]

4.1.4 *C. estertheticum*-like Isolat C 194

Nach einer Inkubation von zehn Tagen bei +10 °C unter anaeroben Bedingungen entstanden makroskopisch sichtbare Kolonien auf CBA. Nach 20 Tagen waren die einzelnen Kolonien glattrandig und rund mit einer glatten, konvexen Oberfläche. Der Durchmesser der Kolonien betrug 1-3 mm. Sie waren opak und von beiger Farbe, im Bereich der Ränder war ein schmaler durchsichtiger Ring erkennbar. Sie zeigten keine Hämolyse auf CBA (Abbildung 14). Im Phasenkontrastmikroskop stellten sich die vegetativen Zellen als plumpe Stäbchen dar. Die Größe der Stäbchen lag zwischen 0,8-1,2 x 2,3-6,5 µm. Im Rasterelektronenmikroskop waren an den vegetativen Zellen deutliche Einschnürungen im vorderen Drittel erkennbar, die Endosporen befanden sich in subterminaler bis terminaler Position (Abbildung 14).

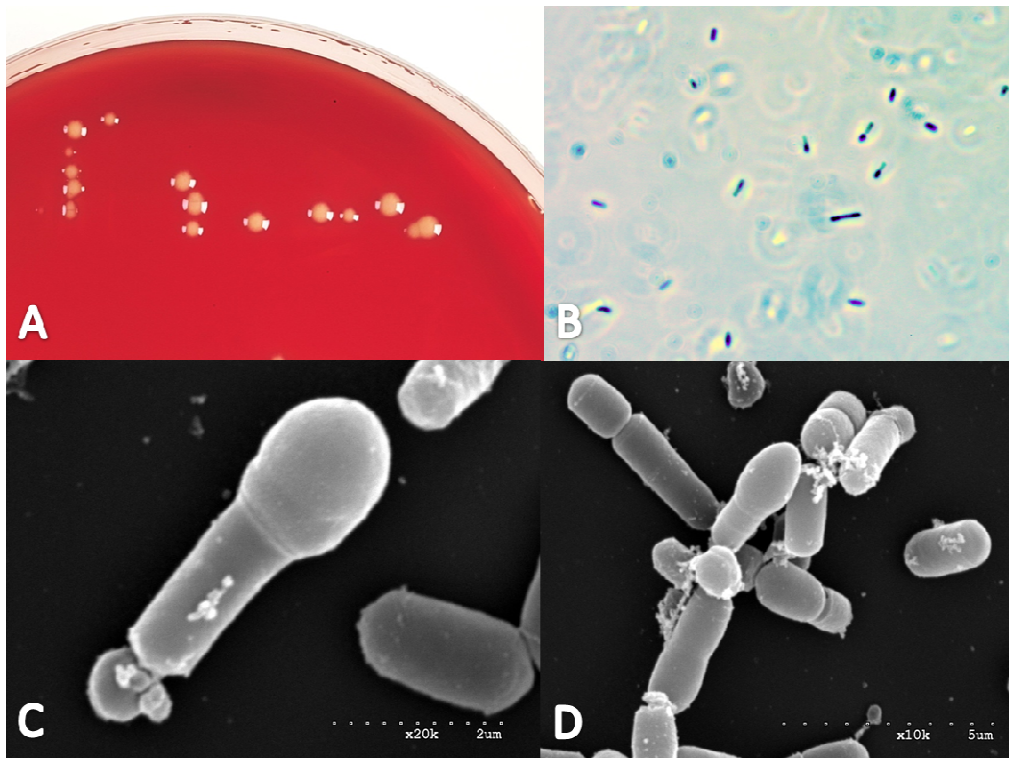


Abbildung 14: Reinkultur von einem *C. estertheticum*-like Isolat (C194) auf CBA (20 Tage, +10 °C, anaerob) [A], im Phasenkontrastmikroskop bei 1000 facher [B] und im Rasterelektronenmikroskop bei 20.000 facher [C] bzw. 10.000 facher Vergrößerung [D]

4.1.5 *C. frigoris*

Der Keim zeigte nach einer Inkubation von 14 Tagen bei +5 °C unter anaeroben Bedingungen makroskopisch sichtbares Koloniewachstum auf CBA. Nach 20 Tagen waren die einzelnen Kolonien rund und schwach konvex mit einer glatten Oberfläche. Die Ränder waren meist glattrandig, vereinzelt auch schwach granuliert. Der Durchmesser der Kolonien betrug 0,5-1 mm. Die Kolonien waren im Inneren weißgrau und undurchsichtig, im Bereich der Ränder war ein schmaler durchsichtiger Ring erkennbar. Sie zeigten keine Hämolyse auf CBA (Abbildung 15). Im Phasenkontrastmikroskop waren die vegetativen Zellen als schlanke Stäbchen erkennbar. Ihre Größe lag zwischen 0,8-1,5 x 2,3-11,5 µm. Im Rasterelektronenmikroskop waren die Stäbchen von regelmäßigem Durchmesser, die Endosporen befanden sich in subterminaler oder terminaler Position (Abbildung 15).

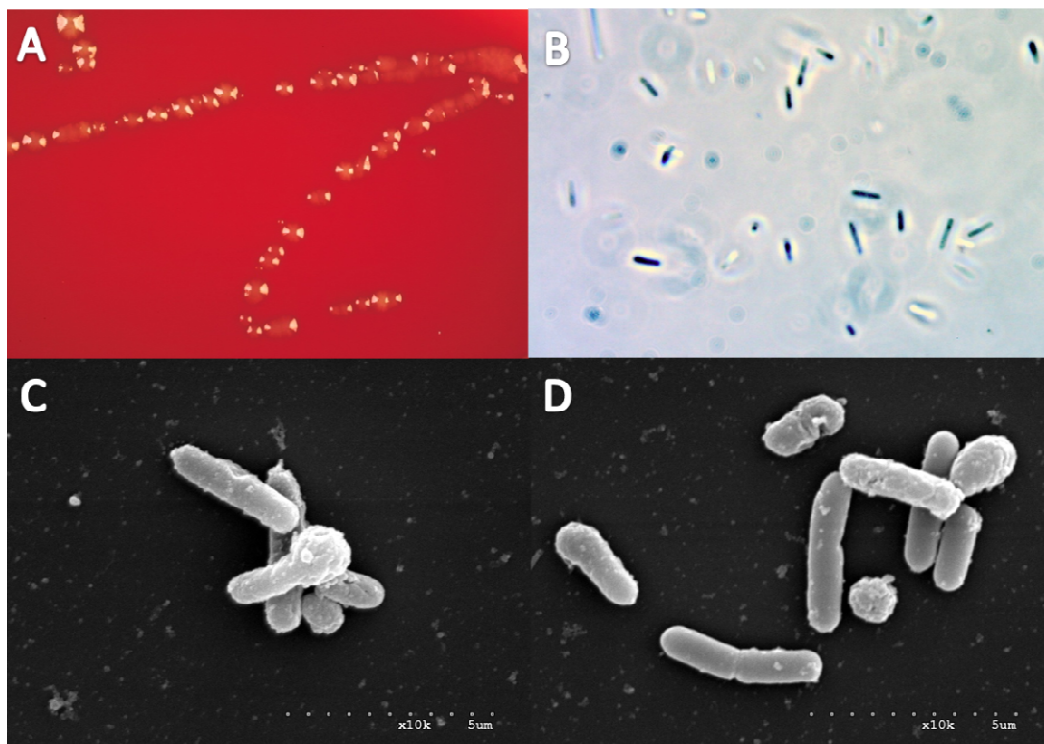


Abbildung 15: Reinkultur von *C. frigoris* (DSMZ 14204) auf CBA (20 Tage, +5 °C, anaerob) [A], im Phasenkontrastmikroskop bei 1000 facher [B] und im Rasterelektronenmikroskop bei 10.000 facher Vergrößerung [C + D]

4.1.6 *C. gasigenes*

Nach einer Inkubation von vier Tagen bei +20 °C unter anaeroben Bedingungen entstanden makroskopisch sichtbare Kolonien auf CBA. Nach 20 Tagen waren die einzelnen Kolonien rund und schwach erhaben, die Ränder waren grob gekörnt. Der Durchmesser der Kolonien betrug 1-2 mm. Sie waren in der Mitte opak cremeweiß, im Bereich der Ränder durchscheinend und gräulich. Sie zeigten keine Hämolyse auf CBA (Abbildung 16). Im Phasenkontrastmikroskop waren die vegetativen Zellen als gerade Stäbchen erkennbar. Ihre Größe lag zwischen 0,4-1,2 x 1,9-11,5 µm. Im Rasterelektronenmikroskop stellten sich die Keime als Stäbchen mit gleichmäßigem Durchmesser dar, die im distalen Drittel kurze Fortsätze bildeten. Die Endosporen befanden sich in subterminaler bis terminaler Position (Abbildung 16).

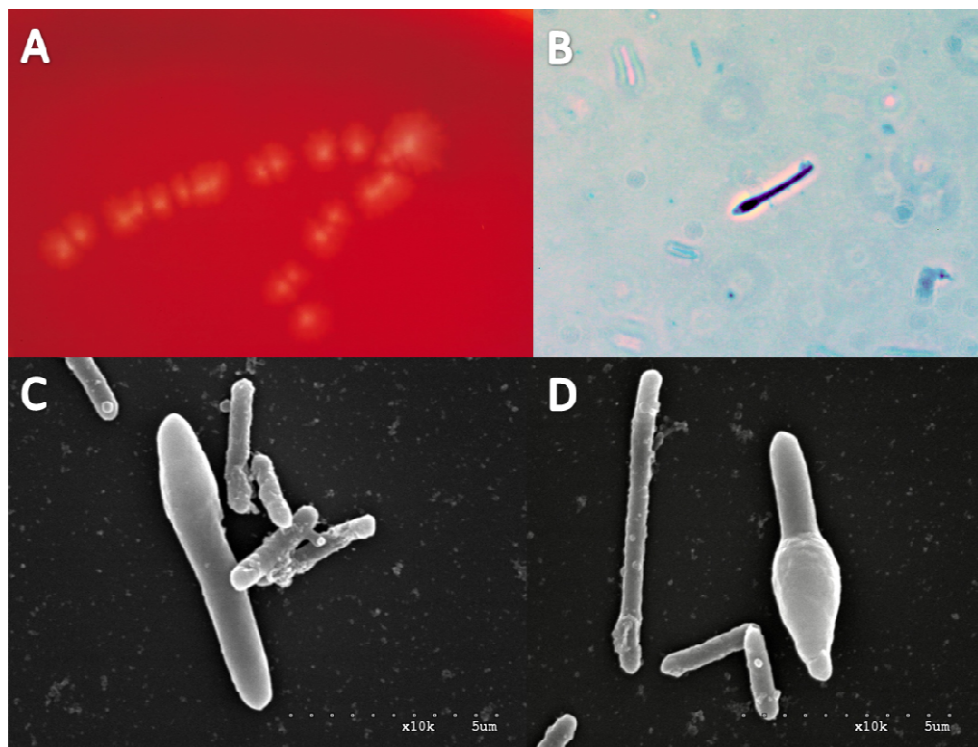


Abbildung 16: Reinkultur von *C. gasigenes* (DSMZ 12272) auf CBA (20 Tage, +20 °C, anaerob) [A], im Phasenkontrastmikroskop bei 1000 facher [B] und im Rasterelektronenmikroskop bei 10.000 facher Vergrößerung [C + D]

4.2 PCR-Entwicklung zum Nachweis von *Clostridium* spp.

4.2.1 PCR zum Nachweis von *C. bowmanii*

Überprüfung der Spezifität

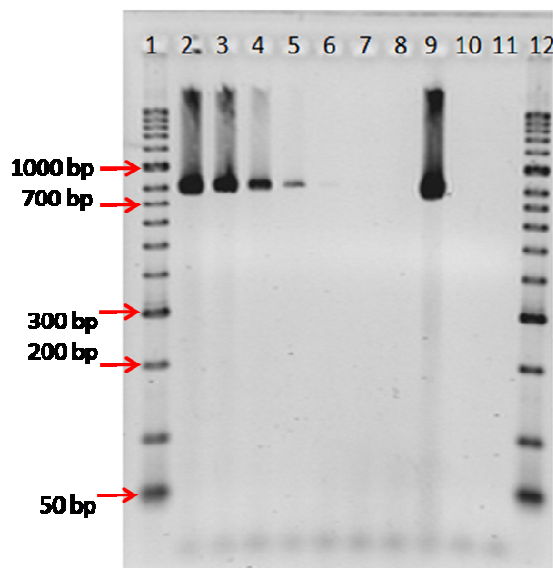
Die Spezifität des PCR-Systems zum Nachweis von *C. bowmanii* wurde überprüft, indem die DNA von den in Tabelle 15 (Kapitel 3.2.2.2) aufgeführten Keimen als Template eingesetzt wurde. Ausschließlich die DNA von *C. bowmanii* (DSMZ 14206) führte zu einer Bande mit einer Länge von 808 Basenpaaren.

Nachweisgrenze für vegetative Zellen

Die Nachweisgrenze der PCR für vegetative Zellen lag für das Primerpaar CBf/CBr bei der konventionellen Gelelektrophorese im Mittel bei $1,4 \times 10^3$ Organismen pro ml Fleischtropfsaft, wobei die Banden der letzten positiven Verdünnungsstufe in der gedruckten Form der vorliegenden Arbeit nur sehr schwach zu erkennen sind (Abbildung 17). Bei Anwendung des Experion Automated Electrophoresis Systems mit Aufreinigung der zuvor neu amplifizierten PCR-Produkte lag die Nachweisgrenze im Mittel bei $1,4 \times 10^4$ Organismen/ml (Abbildung 18). Die einzelnen Ergebnisse der verschiedenen Versuchsdurchführungen sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Ergebnisse zur Nachweisgrenze des PCR-Systems für vegetative Zellen von *C. bowmanii* (DSMZ 14206) mit dem Primerpaar CBf/CBr in Fleischtropfsaft

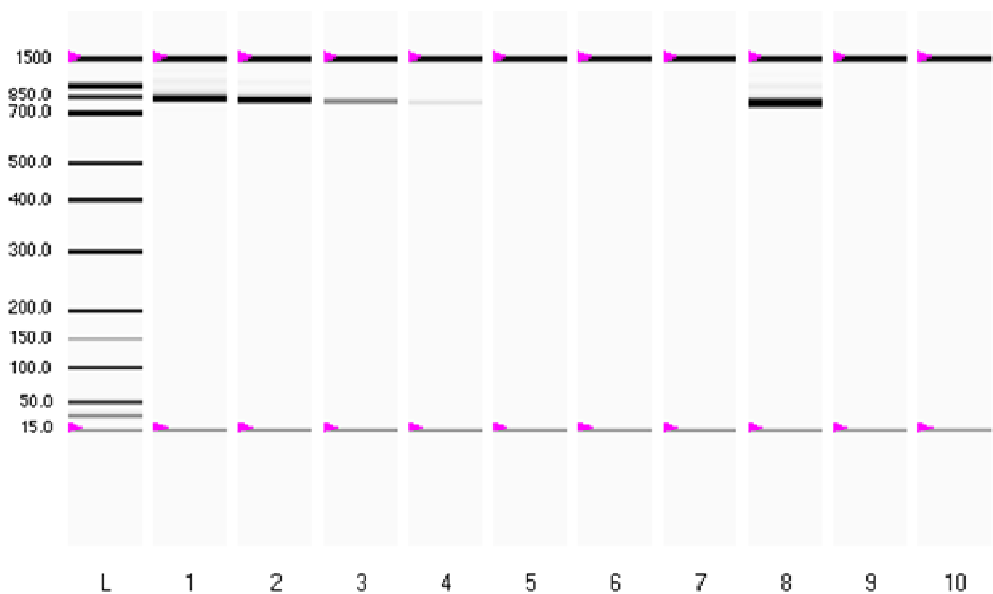
Gelelektrophorese *		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. bowmanii</i> Zellen / ml Tropfsaft
Vegetative 1	Verdünnung 10^{-5} (s)	$1,3 \times 10^3$
Vegetative 2	Verdünnung 10^{-5} (s)	$1,3 \times 10^3$
Vegetative 3	Verdünnung 10^{-5} (s)	$1,6 \times 10^3$
Mittelwert		$1,4 \times 10^3$
Experion Automated Electrophoresis System mit Aufreinigung der PCR-Produkte *		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. bowmanii</i> Zellen / ml Tropfsaft
Vegetative 1	Verdünnung 10^{-4}	$1,3 \times 10^4$
Vegetative 2	Verdünnung 10^{-4}	$1,3 \times 10^4$
Vegetative 3	Verdünnung 10^{-4}	$1,6 \times 10^4$
Mittelwert		$1,4 \times 10^4$
* : Ergebnisse durch Verwendung unterschiedlicher PCR-Amplifikate ermittelt (s) = schwache Bande		



1	Marker (Quantitas 50bp – 2kb)	7	Verdünnung 10^{-6}	-
2	Verdünnung 10^{-1}	8	Verdünnung 10^{-7}	-
3	Verdünnung 10^{-2}	9	Positivkontrolle DSMZ 14206	+
4	Verdünnung 10^{-3}	10	Negativkontrolle DSMZ 8809	-
5	Verdünnung 10^{-4}	11	Reagenzienkontrolle	-
6	Verdünnung 10^{-5}	12	Marker (Quantitas 50bp – 2kb)	

+ = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis (s) = schwach bp = Basenpaare
 * : Auf Abbildung nur sehr schwach zu sehen

Abbildung 17: Elektrophoresegel der Amplifikationsprodukte von mit *C. bowmanii*-Keimen (DSMZ 14206) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. bowmanii*, Durchführung Nr. 1



L	Marker (DNA 1 K ladder)			
1	Verdünnung 10^{-1}	+	6	Verdünnung 10^{-6}
2	Verdünnung 10^{-2}	+	7	Verdünnung 10^{-7}
3	Verdünnung 10^{-3}	+	8	Positivkontrolle DSMZ 14206
4	Verdünnung 10^{-4}	+	9	Negativkontrolle DSMZ 8809
5	Verdünnung 10^{-5}	-	10	Reagenzienkontrolle
+ = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis (s) = schwach				
▶ Im Ladepuffer enthaltene Markierung; zeigt untere und obere Grenze des Markers an				

Abbildung 18: Aufgereinigte Amplifikationsprodukte von mit *C. bowmanii*-Keimen (DSMZ 14206) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. bowmanii* auf einem Chip des Experion Automated Electrophoresis Systems, Durchführung Nr. 1

Die DNA-Extrakte, die in diesen Untersuchungen ein negatives Ergebnis lieferten, wurden in eine Amplifikationskontroll-PCR eingesetzt (Kapitel 3.2.2.3; Abbildung 38). Alle Amplifikationskontrollen waren positiv. Somit wurde die Amplifikation nicht inhibiert.

Nachweisgrenze für Sporen

Während der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit gelang es nicht, eine Sporensuspension von *C. bowmanii* herzustellen. Der Keim zeigte nach einer Inkubationsdauer von einem Jahr bei +15 °C in dem Sporenmedium nach Peck et al. (1992) keine Neigung zum Versporen. Auch in dem nach Spring et al. (2003)

modifizierten DSMZ Medium 63 konnte nach einer Inkubation von 4 Monaten bei +15 °C kein Versporen der Zellen beobachtet werden.

4.2.2 PCR zum Nachweis von *C. frigoris*

Überprüfung der Spezifität

Bei der Überprüfung der Spezifität des PCR-Systems zum Nachweis von *C. frigoris* durch Einsatz der DNA von den in Tabelle 15 (Kapitel 3.2.2.2) aufgeführten Keimen als Template führte ausschließlich die DNA von *C. frigoris* (DSMZ 14204) zu einer Bande mit einer Länge von 685 Basenpaaren.

Nachweisgrenze für vegetative Zellen

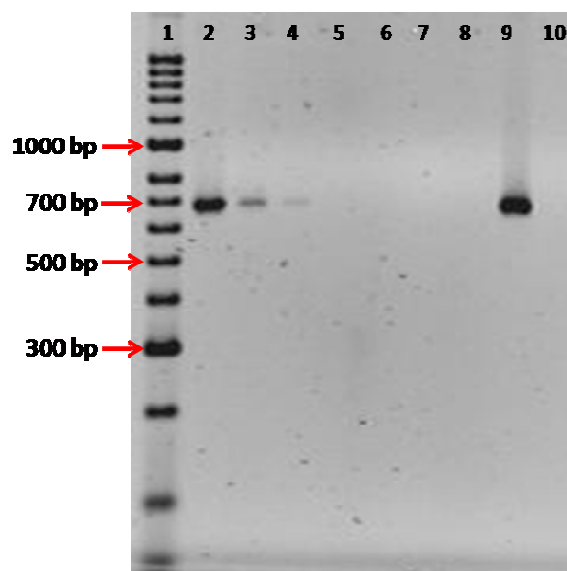
Die Nachweisgrenze der PCR für vegetative Zellen lag für das Primerpaar CFf/CFr bei der konventionellen Gelelektrophorese im Mittel bei $1,6 \times 10^3$ Organismen pro ml Fleischtropfsaft (Abbildung 19). Bei Anwendung des Experion Automated Electrophoresis Systems mit Aufreinigung der zuvor neu amplifizierten PCR-Produkte lag die Nachweisgrenze im Mittel bei $2,2 \times 10^3$ Organismen/ml (Abbildung 20). Die einzelnen Ergebnisse der drei Versuchsdurchführungen sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Ergebnisse zur Nachweisgrenze des PCR-Systems für vegetative Zellen von *C. frigoris* (DSMZ 14204) mit dem Primerpaar CFr/CFr in Fleischtropfsaft

Gelelektrophorese *		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. frigoris</i> Zellen / ml Tropfsaft
Vegetative 1	Verdünnung 10^{-3} (s)	$2,7 \times 10^3$
Vegetative 2	Verdünnung 10^{-3} (s)	$1,9 \times 10^3$
Vegetative 3	Verdünnung 10^{-4} (s)	$1,9 \times 10^2$
Mittelwert		$1,6 \times 10^3$

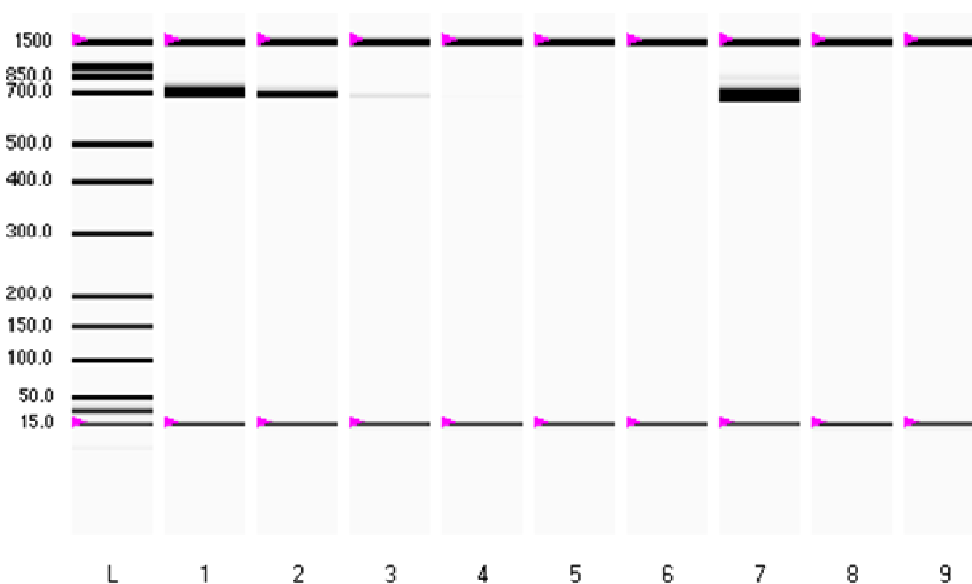
Fortsetzung Tabelle 20

Experion Automated Electrophoresis System mit Aufreinigung der PCR-Produkte *		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. frigoris</i> Zellen / ml Tropfsaft
Vegetative 1	Verdünnung 10^{-3}	$2,7 \times 10^3$
Vegetative 2	Verdünnung 10^{-3} (s)	$1,9 \times 10^3$
Vegetative 3	Verdünnung 10^{-3}	$1,9 \times 10^3$
Mittelwert		$2,2 \times 10^3$
* : Ergebnisse durch Verwendung unterschiedlicher PCR-Amplifikate ermittelt (s) = schwache Bande		



1	Marker (Quantitas 50bp – 2kb)	6	Verdünnung 10^{-5}	-
2	Verdünnung 10^{-1} +	7	Verdünnung 10^{-6}	-
3	Verdünnung 10^{-2} + (s)	8	Negativkontrolle DSMZ 8809	-
4	Verdünnung 10^{-3} + (s) *	9	Positivkontrolle DSMZ 14204	+
5	Verdünnung 10^{-4} -	10	Reagenzienkontrolle	-
+ = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis (s) = schwach bp = Basenpaare				
* : Auf Abbildung nur sehr schwach zu sehen				

Abbildung 19: Elektrophoresegel der Amplifikationsprodukte von mit *C. frigoris*-Keimen (DSMZ 14204) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. frigoris*, Durchführung Nr. 2



L	Marker (DNA 1 K ladder)			
1	Verdünnung 10^{-1}	+	6	Verdünnung 10^{-6} -
2	Verdünnung 10^{-2}	+	7	Positivkontrolle DSMZ 14204 +
3	Verdünnung 10^{-3}	+(s)	8	Negativkontrolle DSMZ 8809 -
4	Verdünnung 10^{-4}	-	9	Reagenzienkontrolle -
5	Verdünnung 10^{-5}	-		
+ = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis (s) = schwach				
▶ Im Ladepuffer enthaltene Markierung; zeigt untere und obere Grenze des Markers an				

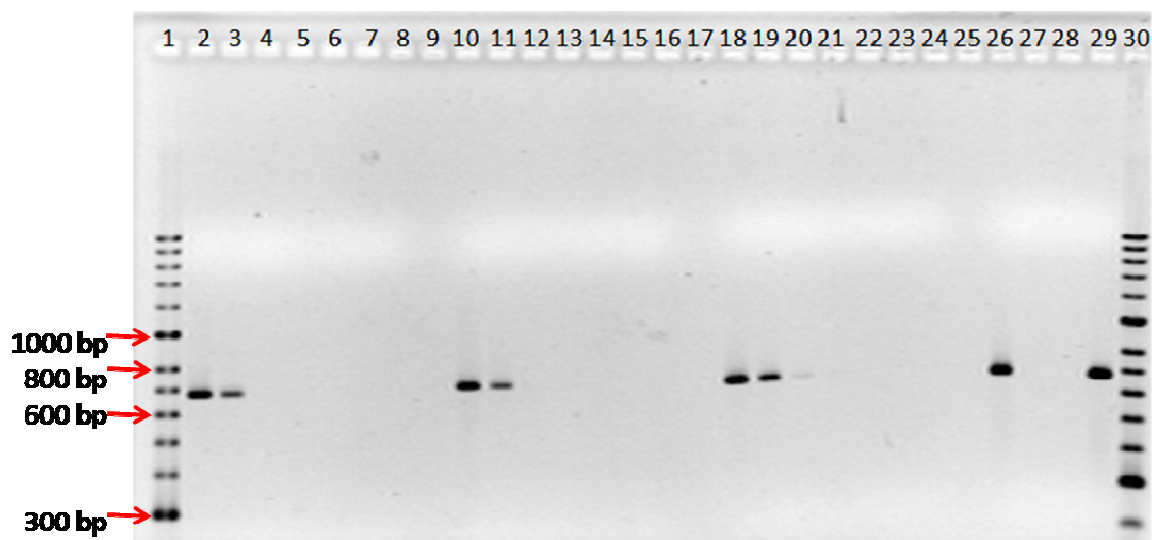
Abbildung 20: Aufgereinigte Amplifikationsprodukte von mit *C. frigoris*-Keimen (DSMZ 14204) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. frigoris* auf einem Chip des Experion Automated Electrophoresis Systems, Durchführung Nr. 1

Nachweisgrenze für Sporen

Die Nachweisgrenze der PCR für Sporen lag für das Primerpaar CFf/CFr bei der konventionellen Gelelektrophorese im Mittel bei $1,6 \times 10^5$ Organismen pro ml Fleischtropfsaft (Abbildung 21). Bei Anwendung des Experion Automated Electrophoresis Systems ohne Aufreinigung der zuvor neu amplifizierten PCR-Produkte lag die Nachweisgrenze im Mittel bei $9,9 \times 10^5$ Organismen/ml (Abbildung 22). Die Banden der letzten positiven Verdünnungsstufe sind in der gedruckten Form der vorliegenden Arbeit sowohl auf Abbildung 21 als auch auf Abbildung 22 nur sehr schwach zu erkennen. Die einzelnen Ergebnisse der drei Versuchsdurchführungen sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

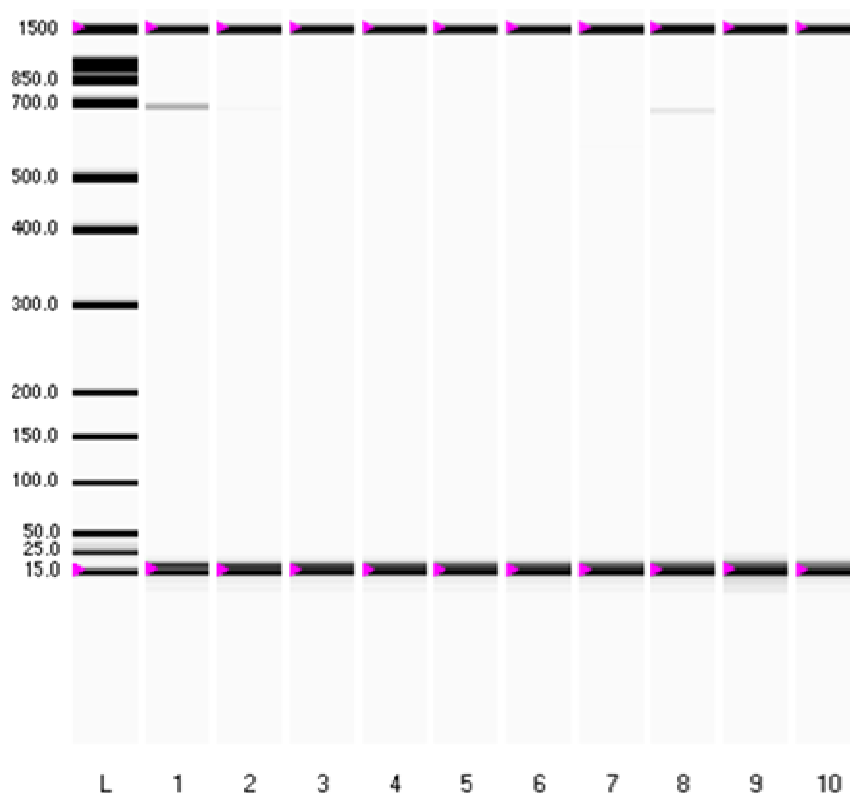
Tabelle 21: Ergebnisse zur Nachweisgrenze des PCR-Systems für Sporen von *C. frigoris* (DSMZ 14204) mit dem Primerpaar CFf/CFr in Fleischtropfsaft

Gelelektrophorese *		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. frigoris</i> Sporen / ml Tropfsaft
Sporen 1	Verdünnung 10^{-3}	$2,1 \times 10^5$
Sporen 2	Verdünnung 10^{-3}	$2,6 \times 10^5$
Sporen 3	Verdünnung 10^{-4} (s)	$1,6 \times 10^4$
Mittelwert		$1,6 \times 10^5$
Experion Automated Electrophoresis System ohne Aufreinigung der PCR-Produkte *		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. frigoris</i> Sporen / ml Tropfsaft
Sporen 1	Verdünnung 10^{-3} (s)	$2,1 \times 10^5$
Sporen 2	Verdünnung 10^{-2}	$2,6 \times 10^6$
Sporen 3	Verdünnung 10^{-3} (s)	$1,6 \times 10^5$
Mittelwert		$9,9 \times 10^5$
* : Ergebnisse durch Verwendung unterschiedlicher PCR-Amplifikate ermittelt (s) = schwache Bande		



Bahn 1-9: Durchführung Nr. 1		Bahn 10-17: Durchführung Nr. 2	
1	Marker (Quantitas 50bp – 2kb)	10	Verdünnung 10^{-2} +
2	Verdünnung 10^{-2} +	11	Verdünnung 10^{-3} +
3	Verdünnung 10^{-3} +	12	Verdünnung 10^{-4} -
4	Verdünnung 10^{-4} -	13	Verdünnung 10^{-5} -
5	Verdünnung 10^{-5} -	14	Verdünnung 10^{-6} -
6	Verdünnung 10^{-6} -	15	Verdünnung 10^{-7} -
7	Verdünnung 10^{-7} -	16	Verdünnung 10^{-8} -
8	Verdünnung 10^{-8} -	17	leer
9	leer		
Bahn 18-25: Durchführung Nr. 3			
18	Verdünnung 10^{-2} +	26	Positivkontrolle DSMZ 14204
19	Verdünnung 10^{-3} +	27	Negativkontrolle DSMZ 14206
20	Verdünnung 10^{-4} + (s)*	28	Reagenzienkontrolle
21	Verdünnung 10^{-5} -	29	Positivkontrolle DSMZ 14204
22	Verdünnung 10^{-6} -	30	Marker (Quantitas 50 bp – 2kb)
23	Verdünnung 10^{-7} -		
24	Verdünnung 10^{-8} -		
25	leer		
+ = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis (s) = schwach bp = Basenpaare			
*: Auf Abbildung nur sehr schwach zu sehen			

Abbildung 21: Elektrophoresegel der Amplifikationsprodukte von mit *C. frigoris*-Sporen (DSMZ 14204) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. frigoris*, Durchführung Nr. 1 – 3



L	Marker (DNA 1 K ladder)			
1	Verdünnung 10^{-2}	+	6	Verdünnung 10^{-7} -
2	Verdünnung 10^{-3}	+ (s)	7	Verdünnung 10^{-8} -
3	Verdünnung 10^{-4}	-	8	Positivkontrolle DSMZ 14204 + (s)
4	Verdünnung 10^{-5}	-	9	Negativkontrolle DSMZ 14206 -
5	Verdünnung 10^{-6}	-	10	Reagenzienkontrolle -
+ = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis (s) = schwach				
▶ Im Ladepuffer enthaltene Markierung; zeigt untere und obere Grenze des Markers an				

Abbildung 22: Nicht-aufgeklärte Amplifikationsprodukte von mit *C. frigoris*-Sporen (DSMZ 14204) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. frigoris* auf einem Chip des Experion Automated Electrophoresis Systems, Durchführung Nr. 1

Die DNA-Extrakte, die in diesen Untersuchungen ein negatives Ergebnis lieferten, wurden in eine Amplifikationskontroll-PCR eingesetzt (Kapitel 3.2.2.3). Alle Amplifikationskontrollen waren positiv. Somit wurde die Amplifikation nicht inhibiert.

4.2.3 PCR zum Nachweis von *C. gasigenes*

Überprüfung der Spezifität

Die Spezifität des Primerpaares 16SDBF/CGr zum Nachweis von *C. gasigenes* wurde überprüft, indem die DNA von den in Tabelle 15 (Kapitel 3.2.2.2) aufgeführten Keimen als Template in das PCR-System eingesetzt wurde. Ausschließlich die DNA von *C. gasigenes* (DSMZ 12272) führte zu einer Bande mit einer Länge von 550 Basenpaaren.

Nachweisgrenze für vegetative Zellen

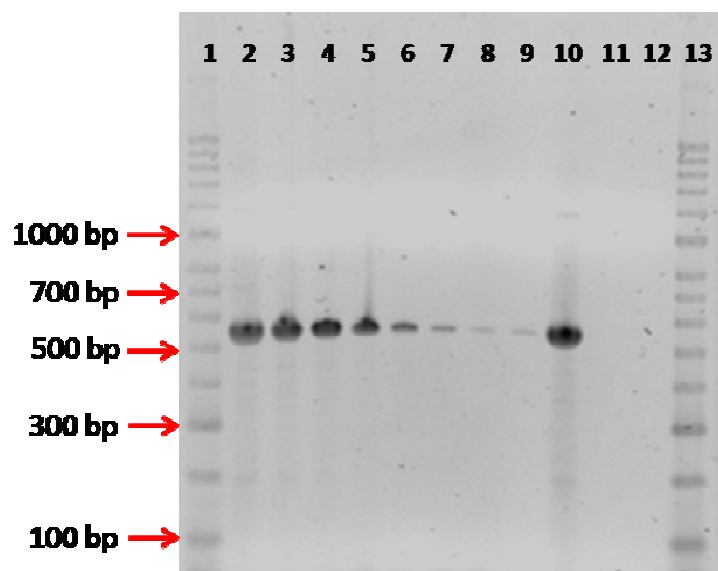
Die Nachweisgrenze der PCR für vegetative Zellen lag für das Primerpaar 16SDBF/CGr bei der konventionellen Gelelektrophorese im Mittel bei $1,4 \times 10^1$ Organismen pro ml Fleischtropfsaft (Abbildung 23). Im Experion Automated Electrophoresis System mit Aufreinigung der zuvor neu amplifizierten PCR-Produkte lag die Nachweisgrenze im Mittel bei $1,6 \times 10^3$ Organismen/ml (Abbildung 24). Die Banden der letzten positiven Verdünnungsstufen sind in der gedruckten Form der vorliegenden Arbeit sowohl auf Abbildung 23 als auch auf Abbildung 24 nur sehr schwach zu erkennen. Die einzelnen Ergebnisse der drei Versuchsdurchführungen sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Ergebnisse zur Nachweisgrenze des PCR-Systems für vegetative Zellen von *C. gasigenes* (DSMZ 12272) mit dem Primerpaar 16SDBF/CGr in Fleischtropfsaft

Gelelektrophorese *		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. gasigenes</i> Zellen / ml Tropfsaft
Vegetative 1	Verdünnung 10^{-8} (s)	4,1
Vegetative 2	Verdünnung 10^{-8} (s)	4,4
Vegetative 3	Verdünnung 10^{-7} (s)	$3,4 \times 10^1$
Mittelwert		$1,4 \times 10^1$

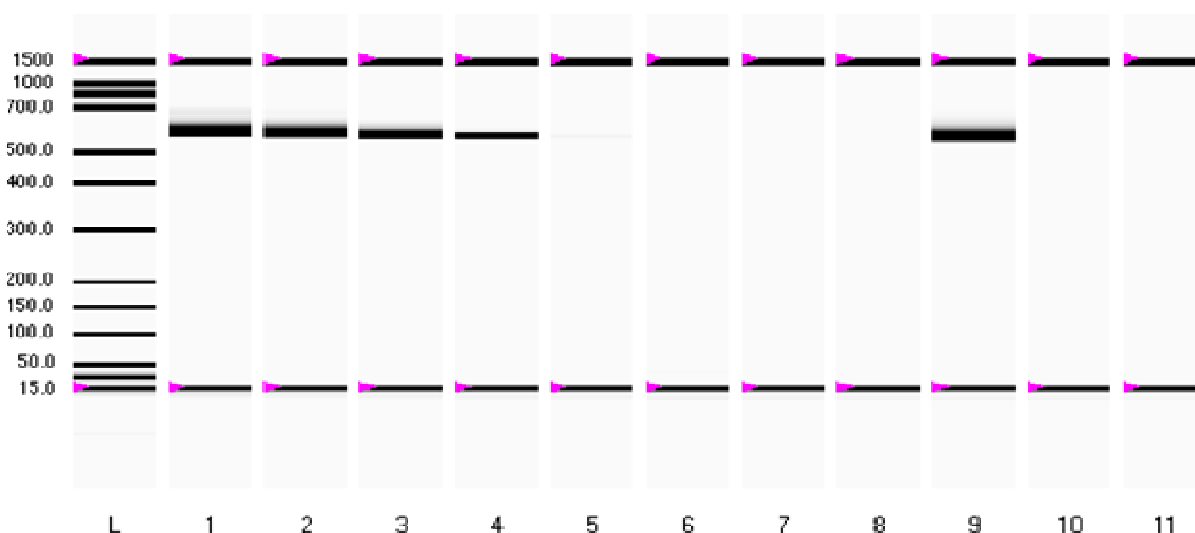
Fortsetzung Tabelle 22

Experion Automated Electrophoresis System mit Aufreinigung der PCR-Produkte *		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. gasigenes</i> Zellen / ml Tropfsaft
Vegetative 1	Verdünnung 10^{-5} (s)	$4,1 \times 10^3$
Vegetative 2	Verdünnung 10^{-6}	$4,4 \times 10^2$
Vegetative 3	Verdünnung 10^{-6} (s)	$3,4 \times 10^2$
Mittelwert		$1,6 \times 10^3$
* : Ergebnisse durch Verwendung unterschiedlicher PCR-Amplifikate ermittelt (s) = schwache Bande		



1	Marker (Quantitas 50 bp – 2kb)				
2	Verdünnung 10 ⁻¹	+	8	Verdünnung 10 ⁻⁷	+ (s)*
3	Verdünnung 10 ⁻²	+	9	Verdünnung 10 ⁻⁸	+ (s)*
4	Verdünnung 10 ⁻³	+	10	Positivkontrolle DSMZ 12272	+
5	Verdünnung 10 ⁻⁴	+	11	Negativkontrolle DSMZ 8809	-
6	Verdünnung 10 ⁻⁵	+	12	Reagenzienkontrolle	-
7	Verdünnung 10 ⁻⁶	+	13	Marker (Quantitas 50 bp – 2kb)	
+ = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis (s) = schwach bp = Basenpaare					
* : Auf Abbildung nur sehr schwach zu sehen					

Abbildung 23: Elektrophoresegel der Amplifikationsprodukte von mit *C. gasigenes*-Keimen (DSMZ 12272) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. gasigenes*, Durchführung Nr. 2



L	Marker (DNA 1 K ladder)		6	Verdünnung 10^{-6}	-
1	Verdünnung 10^{-1}	+	7	Verdünnung 10^{-7}	-
2	Verdünnung 10^{-2}	+	8	Verdünnung 10^{-8}	-
3	Verdünnung 10^{-3}	+	9	Positivkontrolle DSMZ 12272	+
4	Verdünnung 10^{-4}	+	10	Negativkontrolle DSMZ 8809	-
5	Verdünnung 10^{-5}	+(s)	11	Reagenzienkontrolle	-
+ = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis (s) = schwach					
▶ Im Ladepuffer enthaltene Markierung; zeigt untere und obere Grenze des Markers an					

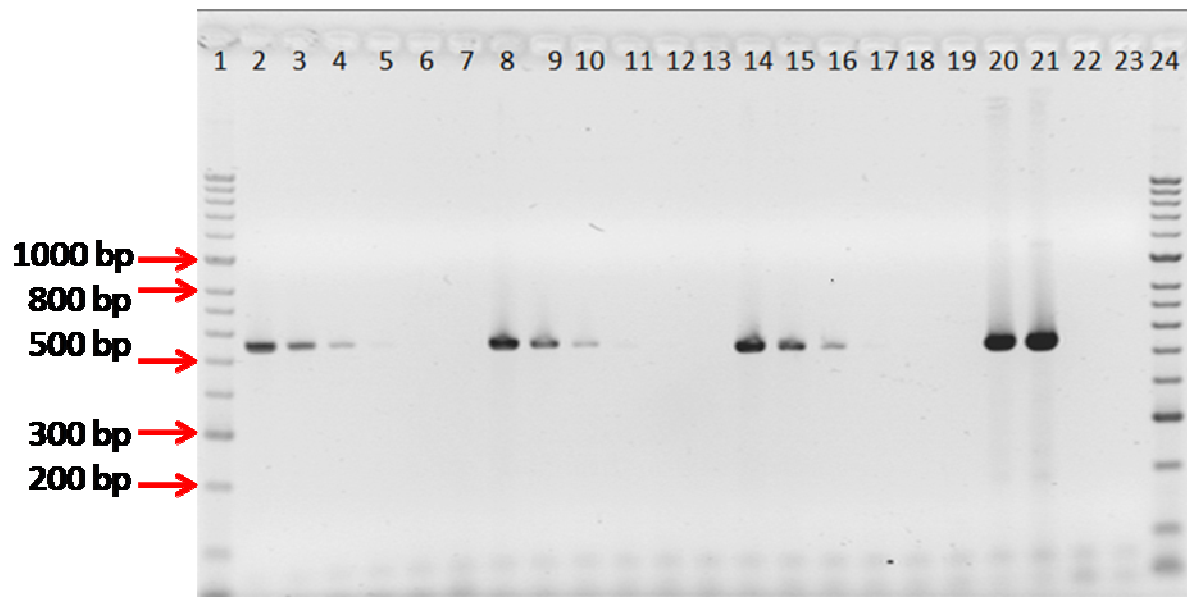
Abbildung 24: Aufgereinigte Amplifikationsprodukte von mit *C. gasigenes*-Keimen (DSMZ 12272) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. gasigenes* auf einem Chip des Experion Automated Electrophoresis Systems, Durchführung Nr. 1

Nachweisgrenze für Sporen

Die Nachweisgrenze der PCR für Sporen lag für das Primerpaar 16SDBF/CGr bei der konventionellen Gelelektrophorese im Mittel bei $4,6 \times 10^2$ Organismen pro ml Fleischtropfsaft (Abbildung 25). Im Experion Automated Electrophoresis System ohne Aufreinigung der zuvor neu amplifizierten PCR-Produkte lag die Nachweisgrenze im Mittel bei $2,9 \times 10^2$ Organismen/ml (Abbildung 26). Die Banden der letzten positiven Verdünnungsstufen sind in der gedruckten Form der vorliegenden Arbeit sowohl auf Abbildung 25 als auch auf Abbildung 26 nur sehr schwach zu erkennen. Die einzelnen Ergebnisse der drei Versuchsdurchführungen sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

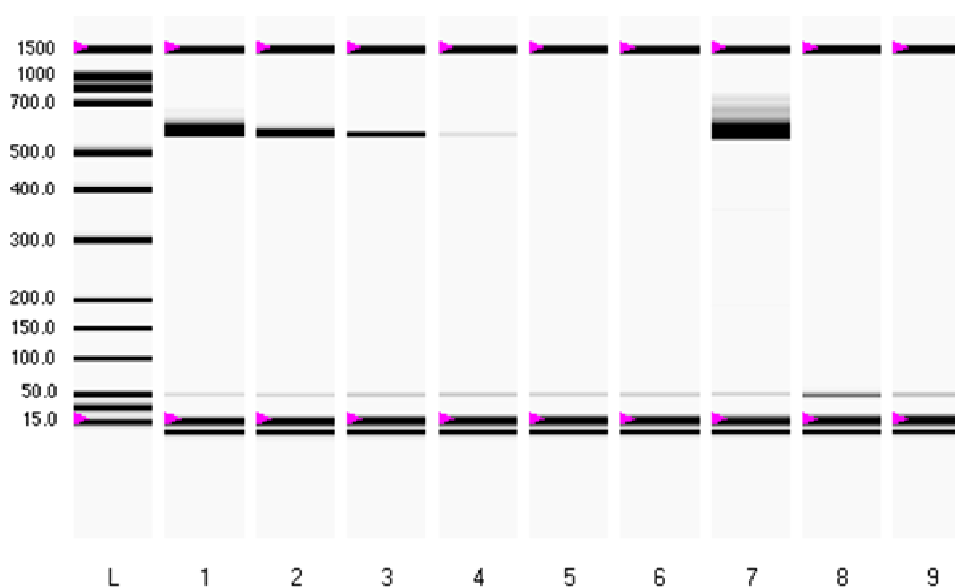
Tabelle 23: Ergebnisse zur Nachweisgrenze des PCR-Systems für Sporen von *C. gasigenes* (DSMZ 12272) mit dem Primerpaar 16SDBF/CGr in Fleischtropfsaft

Gelelektrophorese *		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. gasigenes</i> Sporen / ml Tropfsaft
Sporen 1	Verdünnung 10^{-5} (s)	$3,7 \times 10^2$
Sporen 2	Verdünnung 10^{-5} (s)	$5,5 \times 10^2$
Sporen 3	Verdünnung 10^{-5} (s)	$4,5 \times 10^2$
Mittelwert		$4,6 \times 10^2$
Experion Automated Electrophoresis System ohne Aufreinigung der PCR-Produkte *		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. gasigenes</i> Sporen / ml Tropfsaft
Sporen 1	Verdünnung 10^{-5} (s)	$3,7 \times 10^2$
Sporen 2	Verdünnung 10^{-6} (s)	$5,5 \times 10^1$
Sporen 3	Verdünnung 10^{-5} (s)	$4,5 \times 10^2$
Mittelwert		$2,9 \times 10^2$
* : Ergebnisse durch Verwendung unterschiedlicher PCR-Amplifikate ermittelt (s) = schwache Bande		



Bahn 1-7: Durchführung Nr. 1			Bahn 8-13: Durchführung Nr. 2		
1	Marker (Quantitas 50 bp – 2kb)		8	Verdünnung 10^{-2}	+
2	Verdünnung 10^{-2}	+	9	Verdünnung 10^{-3}	+
3	Verdünnung 10^{-3}	+	10	Verdünnung 10^{-4}	+(s)
4	Verdünnung 10^{-4}	+(s)	11	Verdünnung 10^{-5}	+(s)*
5	Verdünnung 10^{-5}	+(s)*	12	Verdünnung 10^{-6}	-
6	Verdünnung 10^{-6}	-	13	Verdünnung 10^{-7}	-
7	Verdünnung 10^{-7}	-			
Bahn 14-24: Durchführung Nr. 3					
14	Verdünnung 10^{-2}	+	20	Positivkontrolle DSMZ 12272	
15	Verdünnung 10^{-3}	+	21	Positivkontrolle DSMZ 12272	
16	Verdünnung 10^{-4}	+(s)	22	Negativkontrolle DSMZ 8809	
17	Verdünnung 10^{-5}	+(s)*	23	Reagenzienkontrolle	
18	Verdünnung 10^{-6}	-	24	Marker (Quantitas 50 bp – 2kb)	
19	Verdünnung 10^{-7}	-			
+ = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis (s) = schwach					
bp = Basenpaare * : Auf Abbildung nur sehr schwach zu sehen					

Abbildung 25: Elektrophoresegel der Amplifikationsprodukte von mit *C. gasigenes*-Sporen (DSMZ 12272) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. gasigenes*, Durchführung Nr. 1-3



L	Marker (DNA 1 K ladder)		5	Verdünnung 10^{-6}	-
1	Verdünnung 10^{-2}	+	6	Verdünnung 10^{-7}	-
2	Verdünnung 10^{-3}	+	7	Positivkontrolle DSMZ 12272	+
3	Verdünnung 10^{-4}	+	8	Negativkontrolle DSMZ 8809	-
4	Verdünnung 10^{-5}	+ (s)	9	Reagenzienkontrolle	-
+ = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis (s) = schwach					
▶ Im Ladepuffer enthaltene Markierung; zeigt untere und obere Grenze des Markers an					

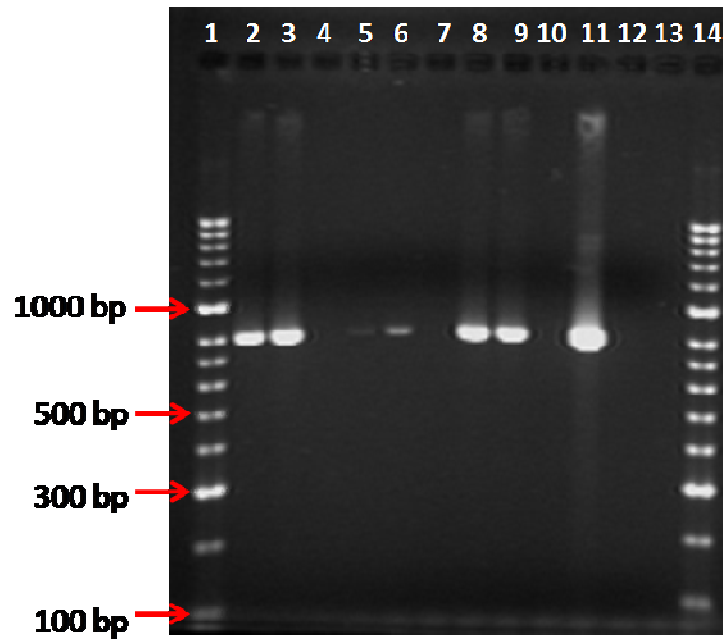
Abbildung 26: Nicht-aufgereinigte Amplifikationsprodukte von mit *C. gasigenes*-Sporen (DSMZ 12272) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. gasigenes* auf einem Chip des Experion Automated Electrophoresis Systems, Durchführung Nr. 3

Die DNA-Extrakte, die in diesen Untersuchungen ein negatives Ergebnis lieferten, wurden in eine Amplifikationskontroll-PCR eingesetzt (Kapitel 3.2.2.3). Alle Amplifikationskontrollen waren positiv. Somit wurde die Amplifikation nicht inhibiert.

4.3 Psychrotolerante *Clostridium* spp. in fleischverarbeitenden Betrieben

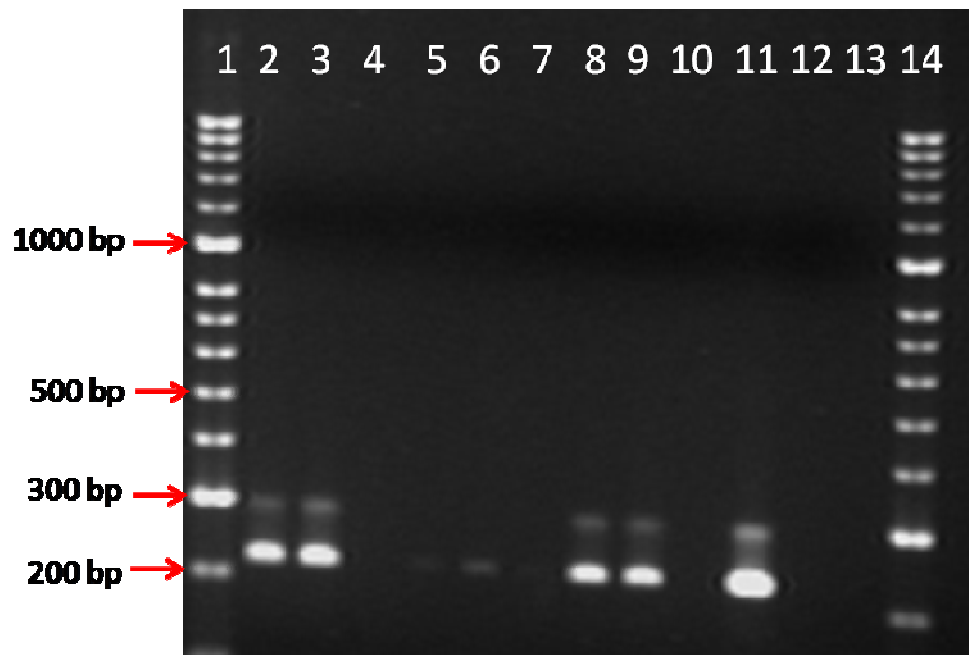
4.3.1 Inokulationsversuche – Kunststoff- und Edelstahloberflächen

Drei verschiedene Oberflächen wurden mit 10^4 CEE Sporen/cm² beimpft. Die Sporen von CEE konnten sowohl mit dem Primerpaar 16SEF/16SER als auch mit dem Primerpaar EISRF/EISRR auf glatten und eingekerbten Kunststoffplättchen sowie auf Edelstahlplättchen nachgewiesen werden. Wie aus den Abbildungen 27 und 28 hervor geht, ist die Bandenstärke bei den eingekerbten Kunststoffplättchen bei beiden Primerpaaren deutlich schwächer als bei den glatten Kunststoff- und den Edelstahlplättchen. Die Ergebnisse waren in allen drei Versuchsdurchführungen reproduzierbar.



1	Marker (Quantitas 50 bp – 2kb)	8	Edelstahl, beimpft 1	+
2	glatt, beimpft 1	9	Edelstahl, beimpft 2	+
3	glatt, beimpft 2	10	Edelstahl, unbeimpft	-
4	glatt, unbeimpft	11	Positivkontrolle DSMZ 8809	+
5	eingekerbt, beimpft 1	12	Negativkontrolle DSMZ 12272	-
6	eingekerbt, beimpft 2	13	Reagenzienkontrolle	-
7	eingekerbt, unbeimpft	14	Marker (Quantitas 50 bp – 2kb)	
+ = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis (s) = schwach bp = Basenpaare				

Abbildung 27: Ergebnisse des Inokulationsversuches zum Nachweis von Sporen von *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* (DSMZ 8809) mittels 16SE-Primerpaar (Broda et al., 2003a) von drei verschiedenen Oberflächen auf einem Elektrophoresegel im Doppelansatz



1	Marker (Quantitas 50 bp – 2kb)	8	Edelstahl, beimpft 1	+
2	glatt, beimpft 1	9	Edelstahl, beimpft 2	+
3	glatt, beimpft 2	10	Edelstahl, unbeimpft	-
4	glatt, unbeimpft	11	Positivkontrolle DSMZ 8809	+
5	eingekerbt, beimpft 1	12	Negativkontrolle DSMZ 12272	-
6	eingekerbt, beimpft 2	13	Reagenzienkontrolle	-
7	eingekerbt, unbeimpft	14	Marker (Quantitas 50 bp – 2kb)	

+ = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis (s) = schwach bp = Basenpaare

Abbildung 28: Ergebnisse des Inokulationsversuches zum Nachweis von Sporen von *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* (DSMZ 8809) mittels EISR-Primerpaar (Broda et al., 2003a) von drei verschiedenen Oberflächen auf einem Elektrophoresegel im Doppelansatz

Die DNA-Extrakte, die in diesen Untersuchungen ein negatives Ergebnis lieferten, wurden in eine Amplifikationskontroll-PCR eingesetzt (Kapitel 3.2.2.3). Alle Amplifikationskontrollen waren positiv. Somit wurde die Amplifikation nicht inhibiert.

4.3.2 Betrieb A

4.3.2.1 Ausgangssituation

Der hygienische Gesamteindruck des Betriebes war mäßig. Arbeitsgeräte waren zum Teil stark verschmutzt und mit Schimmel verunreinigt (Abbildungen 29 und 30).



Abbildung 29: Mit Schimmel verunreinigte Knochensäge in Betrieb A



Abbildung 30: Verschmutzter An- und Ausschalter der Bandsäge in Betrieb A

Von den 20 Tupferproben, die wie unter Kapitel 3.2.3.2 beschrieben an zehn verschiedenen Stellen des Betriebes genommen wurden, ergaben 15 Proben ein positives Signal beim PCR-Screening mit dem Primerpaar 16SEF/16SER. Bei 13 dieser Proben war zusätzlich das PCR-Ergebnis mit dem Primerset EISRF/EISRR positiv, weshalb sie als *C. estertheticum* eingeordnet wurden. Abbildung 31 zeigt den

Grundriss von Betrieb A mit den Ergebnissen des Nachweises von *C. estertheticum*/*C. estertheticum*-like Organismen für die jeweiligen Probenahmeorte. Die genaue Auftrennung der Ergebnisse nach *C. estertheticum*/*C. estertheticum*-like Organismen ist Tabelle 24 zu entnehmen.

Bei den Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass das von Broda et al. (2003a) beschriebene Primerpaar 16SEF/16SER neben *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Organismen auch *C. bowmanii* und *C. frigoris* erfasste.

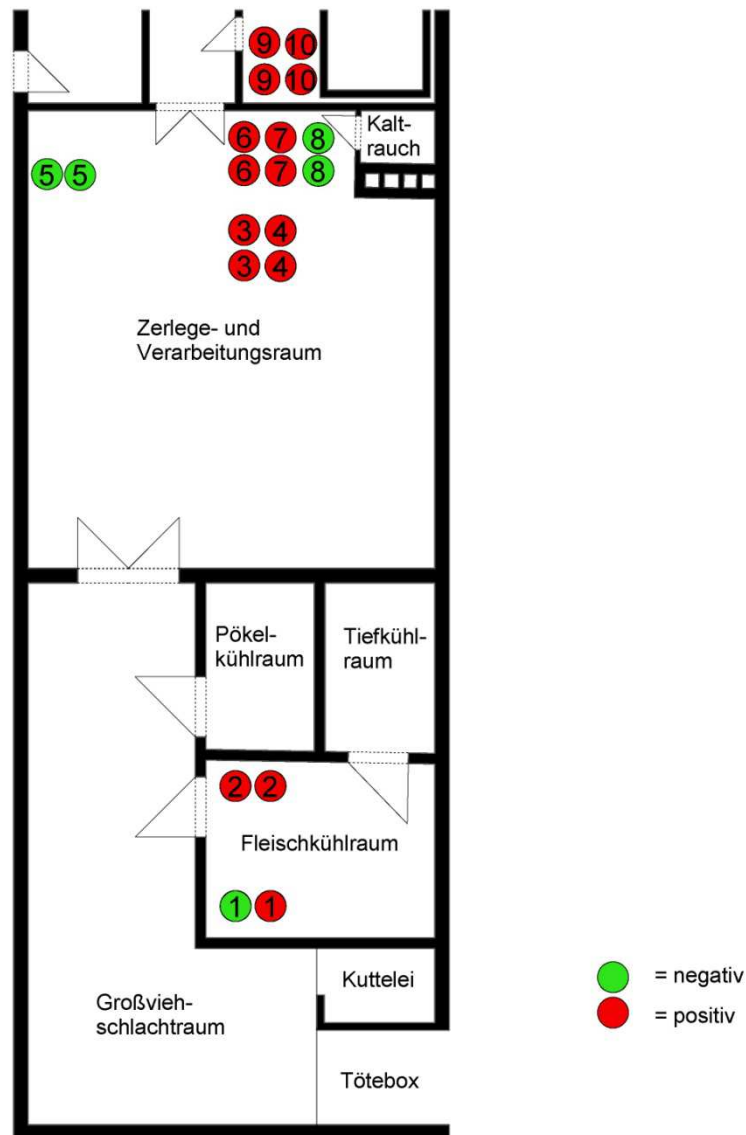
Das dabei gebildete Amplifikat hatte eine Größe von 790 bp. Aus diesem Grund hatte das genannte Primerset eine Screeningfunktion inne, so dass im Folgenden nur noch die Tupferproben auf *C. bowmanii* und *C. frigoris* untersucht wurden, die bereits ein positives Signal mit dem Primerpaar 16SEF/16SER ergeben hatten.

Daher wurden anschließend ausschließlich die 15 positiven Tupferproben in die PCR-Systeme zum Nachweis von *C. bowmanii* und *C. frigoris* eingesetzt. *C. bowmanii* konnte in keiner der Proben nachgewiesen werden. Sieben der Tupferproben ergaben ein positives Ergebnis im PCR-Screening auf *C. frigoris*. Im Einzelnen waren Probe A und B an Probenahmeort 2, Probe B an Stelle 6, sowie beide Proben an den Stellen 9 und 10 positiv auf *C. frigoris*. Wie aus Tabelle 24 hervor geht, sind alle Probenahmeorte, die beim Nachweis von *C. frigoris* ein positives Ergebnis erbrachten auch beim Nachweis von *C. estertheticum* mittels EISR-Primerset positiv. Das PCR-Screening aller 20 Tupferproben auf *C. gasigenes* verlief negativ.

Tabelle 24: Ergebnisse der PCR-Untersuchungen der ersten Beprobung von Betrieb A auf *C. estertheticum*/*C. estertheticum*-like Organismen und *C. frigoris*

Beprobte Stelle	16SEF/16SER		EISRF/EISRR		Einordnung anhand 16SEF/16SER und EISRF/EISRR	
	Probe A	Probe B	Probe A	Probe B	Probe A	Probe B
1 Boden im Fleischkühlraum, unter Rindfleisch	-	+	-	+	negativ	CE
2 Boden im Fleischkühlraum, Eckbereich	+ *	+ *	+	+	CE	CE
3 Zerlegetisch	+	+	+	+	CE	CE
4 Knochensäge direkt über Zerlegetisch hängend	+	+	-	-	CE-L	CE-L
5 Bandsäge	-	-	-	-	negativ	negativ
6 Zerlegebrett	+	+ *	+	+	CE	CE
7 Stechschürze	+	+	+	+	CE	CE
8 Stechhandschuh	-	-	-	-	negativ	negativ
9 Tropfsaft vom Rind aus der Fassreifung	+ *	+ *	+	+	CE	CE
10 Tropfsaft vom Schwein aus der Fasslagerung	+ *	+ *	+	+	CE	CE

CE = *C. estertheticum* CE-L = *C. estertheticum-like* + = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis
 * : an diesen Stellen verlief zusätzlich der Nachweis von *C. frigoris* mit dem Primerpaar CFf/CFr positiv

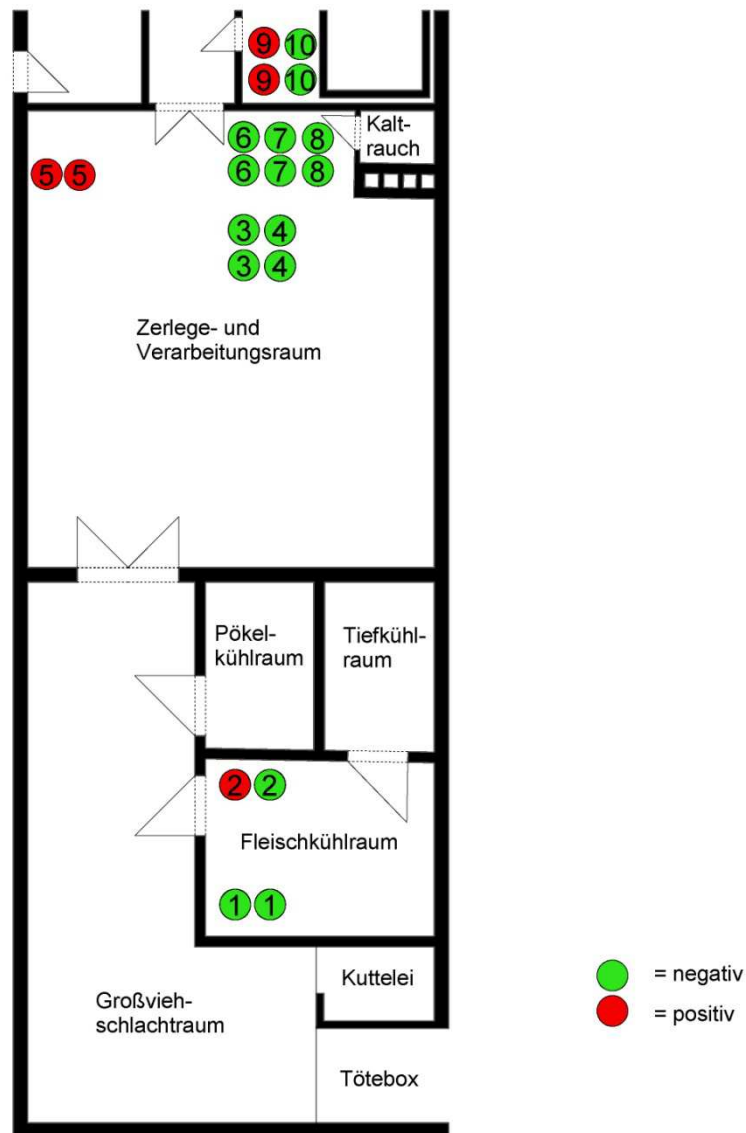


Nummer	Ort
1	Boden im Fleischkühlraum, direkt unter abhängendem Rindfleisch
2	Boden im Fleischkühlraum, Eckbereich
3	Zerlegetisch
4	Knochensäge direkt über Zerlegetisch hängend
5	Bandsäge
6	Zerlegebrett
7	Stechschürze
8	Stechhandschuh
9	Tropfsaft vom Rind aus der Fassreifung
10	Tropfsaft vom Schwein aus der Fasslagerung

Abbildung 31: Grundriss von Betrieb A mit PCR-Befunden zu *C. estertheticum*/*C. estertheticum*-like Organismen. Untersuchung der Ausgangssituation. (vgl. Tabelle 24)

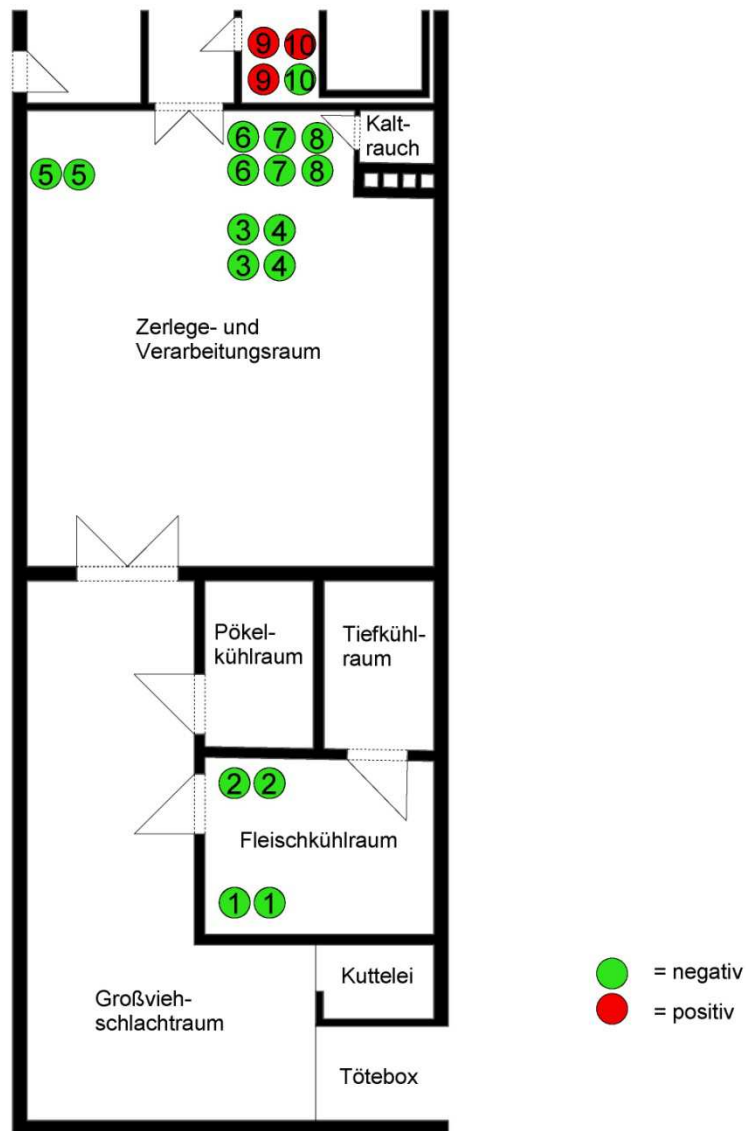
4.3.2.2 Situation nach Behandlung mit peressigsäurehaltigem Desinfektionsmittel

Der Betrieb wurde zwischen Juli und Dezember 2009 jede zweite Woche durch die Mitarbeiter von Betrieb A mit einem peressigsäurehaltigem Desinfektionsmittel (Antisept 33) desinfiziert. Daraufhin ergaben fünf Proben der zweiten Probenahme ein positives Signal beim PCR-Screening mit dem Primerpaar 16SEF/16SER. Alle fünf Proben waren außerdem in der PCR-Untersuchung mit dem Primerset EISRF/EISRR positiv, weshalb sie gesamt als *C. estertheticum* eingeordnet wurden. Abbildung 32 zeigt den Grundriss von Betrieb A mit den Ergebnissen der Untersuchungen auf *C. estertheticum* für die jeweiligen Stellen der Probenahme. Die fünf positiven Tupferproben wurden anschließend in die PCR-Systeme zum Nachweis von *C. bowmanii* und *C. frigoris* eingesetzt. *C. bowmanii* wurde in keiner Probe nachgewiesen. Probe A und B von Probenahmeort 9 waren im PCR-Screening auf *C. frigoris* positiv. Somit wurde an diesen beiden Stellen neben *C. estertheticum* auch *C. frigoris* nachgewiesen. Das PCR-Screening auf *C. gasigenes* ergab für keine der 20 Proben ein positives Ergebnis.



Nummer	Ort
1	Boden im Fleischkühlraum, direkt unter abhängendem Rindfleisch
2	Boden im Fleischkühlraum, Eckbereich
3	Zerlegetisch
4	Knochensäge direkt über Zerlegetisch hängend
5	Bandsäge
6	Zerlegebrett
7	Stechschürze
8	Stechhandschuh
9	Tropfsaft vom Rind aus der Fassreifung
10	Tropfsaft vom Schwein aus der Fasslagerung

Abbildung 32: Grundriss von Betrieb A mit PCR-Befunden zu *C. estertheticum*, nachdem ein peressigsäurehaltiges Desinfektionsmittel in das Reinigungsmanagement aufgenommen wurde



Nummer	Ort
1	Boden im Fleischkühlraum, direkt unter abhängendem Rindfleisch
2	Boden im Fleischkühlraum, Eckbereich
3	Zerlegetisch
4	Knochensäge direkt über Zerlegetisch hängend
5	Bandsäge
6	Zerlegebrett
7	Stechschürze
8	Stechhandschuh
9	Tropfsaft vom Rind aus der Fassreifung
10	Tropfsaft vom Schwein aus der Fasslagerung

Abbildung 33: Grundriss von Betrieb A mit den PCR-Befunden zu *C. estertheticum*/*C. estertheticum*-like Organismen (vgl. Tabelle 25)

4.3.3 Betrieb B

4.3.3.1 Ausgangssituation

Der Betrieb machte einen sehr guten hygienischen Eindruck. Sechs der 20 Tupferproben, die wie unter Kapitel 3.2.3.2 beschrieben an zehn verschiedenen Stellen des Betriebes genommen wurden, ergaben beim PCR-Screening mit dem Primerpaar 16SEF/16SER ein positives Signal. Drei dieser Proben wurden als *C. estertheticum* eingeordnet, nachdem zusätzlich das PCR-Ergebnis mit dem Primerset EISRF/EISRR positiv war. Abbildung 34 zeigt den Grundriss von Betrieb B mit den Ergebnissen des Nachweises von *C. estertheticum*/*C. estertheticum*-like Organismen für die jeweiligen Probenahmeorte. Die genaue Auftrennung der Ergebnisse nach *C. estertheticum*/*C. estertheticum*-like Organismen ist Tabelle 27 zu entnehmen. Anschließend wurden die sechs positiven Tupferproben in die PCR-Systeme zum Nachweis von *C. bowmanii* und *C. frigoris* eingesetzt. *C. bowmanii* wurde in keiner der Proben nachgewiesen. Probe A an Probenahmeort 4 ergab ein positives Ergebnis im PCR-Screening auf *C. frigoris*. Somit wurde an dieser Stelle sowohl *C. estertheticum* als auch *C. frigoris* nachgewiesen. *C. gasigenes* wurde in keiner der 20 Proben nachgewiesen.



Nummer	Ort
1	Boden im Fleischkühlraum, direkt unter abhängendem Rindfleisch
2	Weißer Fleischkiste, gefüllt mit frischem unverpacktem Rindfleisch
3	Rote Fleischkiste gefüllt mit Knochenware/vakuumverpacktem Rindfleisch
4	Gullyrinne im Zerlegeraum
5	Edelstahlstisch zur Vorbereitung der Vakuumierung
6	Zerlegetisch
7	Gully Zerlegeraum
8	Lüftung Zerlegeraum
9	Stechschürze
10	Wischblatt des Bodenreinigungsgerätes

Abbildung 34: Grundriss von Betrieb B mit den PCR-Befunden zu *C. estertheticum*/*C. estertheticum*-like Organismen. Untersuchung der Ausgangssituation (vgl. Tabelle 27)

Tabelle 27: Ergebnisse der PCR-Untersuchungen der ersten Beprobung von Betrieb B auf *C. estertheticum*/*C. estertheticum*-like Organismen und *C. frigoris*

Beprobte Stelle	16SEF/16SER		EISRF/EISRR		Einordnung anhand 16SEF/16SER und EISRF/EISRR	
	Probe A	Probe B	Probe A	Probe B	Probe A	Probe B
1 Boden Fleischkühlraum, unter Rindfleisch	-	-	-	-	negativ	negativ
2 Fleischkiste weiß	-	-	-	-	negativ	negativ
3 Fleischkiste rot	+	-	-	-	CE-L	negativ
4 Gullyrinne im Zerlegeraum	+ *	-	+	-	CE	negativ
5 Edelstahltisch, Vorbereitung der Vakuumierung	-	-	-	-	negativ	negativ
6 Zerlegetisch	-	-	-	-	negativ	negativ
7 Gully Zerlegeraum	+	+	-	-	CE-L	CE-L
8 Lüftung Zerlegeraum	+	-	+	-	CE	negativ
9 Stechschürze	-	-	-	-	negativ	negativ
10 Wischblatt des Bodenreinigungsgerätes	+	-	+	-	CE	negativ
CE = <i>C. estertheticum</i> CE-L = <i>C. estertheticum</i> -like + = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis						
* : an dieser Stelle verlief zusätzlich der Nachweis von <i>C. frigoris</i> mit dem Primerpaar CFf/CFr positiv						

4.3.3.2 Situation nach Behandlung mit peressigsäurehaltigem Desinfektionsmittel

In die täglichen Reinigungsarbeiten des Betriebes wurde ein peressigsäurehaltiges Desinfektionsmittel eingebunden. Bei der zweiten Beprobung ergab das PCR-Screening mit den Primerpaaren 16SEF/16SER und EISRF/EISRR für alle 20 Tupferproben negative Ergebnisse. Das PCR-Screening auf *C. gasigenes* ergab ebenfalls für keine der 20 Proben ein positives Ergebnis.

4.3.4 Betrieb C

4.3.4.1 Ausgangssituation

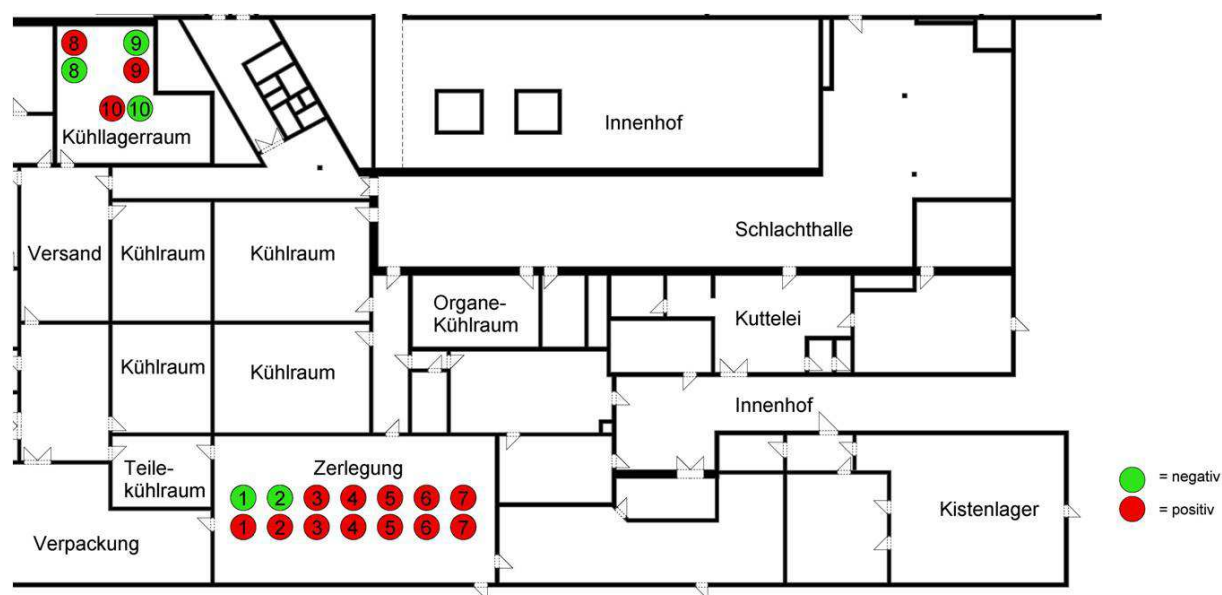
Der hygienische Gesamteindruck des Betriebes war bis auf das eingesetzte Zerlegeband gut (Abbildung 35). Es war erst wenige Monate alt, bestand aus Kunststoff und war auf Grund seiner Bauweise ungeeignet für Rohware, da es nur sehr schwer zu reinigen war. Die erste vollständige mechanische Reinigung des Zerlegebandes wurde laut Aussage des Qualitätsmanagements des Betriebes durchgeführt, nachdem es sechs Monate in Betrieb war.



Abbildung 35: Zerlegeband aus Betrieb C. Durch die Gliederkonstruktion war eine vollständige Reinigung und Desinfektion im Dreischichtbetrieb des Unternehmens nicht durchführbar

In dem Betrieb wurden 20 Tupferproben an zehn verschiedenen Stellen des Betriebes genommen, wie unter Kapitel 3.2.3.2 beschrieben. Davon ergaben 15 Proben ein positives Signal beim PCR-Screening mit dem Primerpaar 16SEF/16SER. Desweiteren ergaben alle 15 Proben ein positives Ergebnis mit dem Primerset EISRF/EISRR, weshalb sie gesamt als *C. estertheticum* eingeordnet wurden. Abbildung 36 zeigt den Grundriss von Betrieb C mit den Ergebnissen des Nachweises von *C. estertheticum* für die jeweiligen Probenahmeorte. Im Anschluss wurden die 15 positiven Tupferproben in die PCR-Systeme zum Nachweis von *C. bowmanii* und *C. frigoris* eingesetzt. Das PCR-Screening auf *C. bowmanii* verlief bei allen Proben negativ. Drei Tupferproben ergaben ein positives Ergebnis im PCR-Screening auf *C. frigoris* (Tabelle 28). Somit wurden an diesen Stellen sowohl *C. estertheticum* als auch *C. frigoris* nachgewiesen. *C. gasigenes* wurde in zwölf der 20 Proben nachgewiesen. In Tabelle 28 sind die Ergebnisse der einzelnen PCR-Nachweise zusammengefasst.

	C. <i>estertheticum</i>	C. <i>frigoris</i>	C. <i>gasigenes</i>
Beprobte Stelle	Probe A	Probe B	Probe A Probe B
1 Oberfläche Zerlegeband	-	+	/ -
2 Fünf Glieder des Zerlegebandes	-	+	/ +
3 Verbindungsgestänge des Zerlegebandes	+	+	- -
4 Führungsrolle des Zerlegebandes	+	+	+ -
5 Eisengestänge über dem Zerlegeband	+	+	- -
6 Zerlegebrett	+	+	- -
7 Stoffhandschuh von Zerlegepersonal	+	+	+ -
8 Boden im Kühlagererraum, Randbereich	+	-	- /
9 Metallverkleidung der Wand im Kühlagererraum	-	+	/ -
10 Gully im Kühlagererraum	+	-	- /
+ = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis / = PCR nicht durchgeführt			

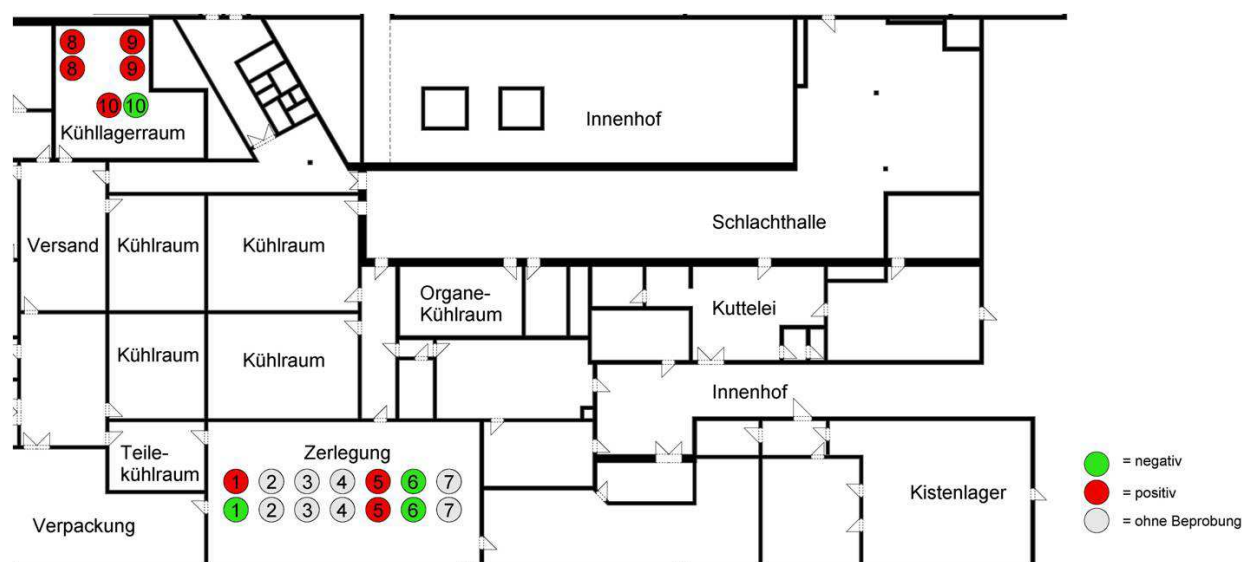


Nummer	Ort
1	Oberfläche Zerlegeband
2	Fünf Glieder des Zerlegebandes
3	Verbindungsgestänge des Zerlegebandes
4	Führungsrolle des Zerlegebandes
5	Eisengestänge über dem Zerlegeband
6	Zerlegebrett
7	Stoffhandschuh von Zerlegepersonal
8	Boden im Kühlagererraum, Randbereich
9	Metallverkleidung der Wand im Kühlagererraum
10	Gully im Kühlagererraum

Abbildung 36: Grundriss von Betrieb C mit den PCR-Befunden zu *C. estertheticum*.
Untersuchung der Ausgangssituation

4.3.4.2 Situation nach Vernebelung mit einem kationischen Polymer aus der Gruppe der Guanidine

Nachdem die Schlacht- und Zerlegehalle mit einem kationischen Polymer aus der Gruppe der Guanidine vernebelt wurden (Akafo[®], Aka-Technology GmbH), fand eine erneute Beprobung des Betriebes statt. Aufgrund mangelnder Kooperationsbereitschaft des Qualitätsmanagements von Betrieb C konnten dabei nur noch sechs der zehn Stellen erneut beprobt werden. Von den insgesamt zwölf Tupferproben waren acht Proben im PCR-Screening mit den Primerpaaren 16SEF/16SER und EISRF/EISRR positiv und wurden als *C. estertheticum* eingeordnet. Vier Tupferproben ergaben ein negatives Ergebnis. Abbildung 37 zeigt den Grundriss von Betrieb C mit den Ergebnissen des Nachweises von *C. estertheticum* für die jeweiligen Probenahmeorte. Die acht positiven Proben wurden anschließend in die PCR-Systeme zum Nachweis von *C. bowmanii* und *C. frigoris* eingesetzt. Probe A von Probenahmeort 10 lieferte ein positives Ergebnis für *C. bowmanii*. Somit wurde an dieser Stelle sowohl *C. estertheticum* als auch *C. bowmanii* nachgewiesen. Das PCR-Screening auf *C. frigoris* verlief negativ. Das PCR-Screening auf *C. gasigenes* ergab für keine der zwölf Proben ein positives Ergebnis.



Nummer	Ort
1	Oberfläche Zerlegeband
2	Fünf Glieder des Zerlegebandes
3	Verbindungsgestänge des Zerlegebandes
4	Führungsrolle des Zerlegebandes
5	Eisengestänge über dem Zerlegeband
6	Zerlegebrett
7	Stoffhandschuh von Zerlegepersonal
8	Boden im Kühlageraum, Randbereich
9	Metallverkleidung der Wand im Kühlageraum
10	Gully im Kühlageraum

Abbildung 37: Grundriss von Betrieb C mit den PCR-Befunden zu *C. estertheticum* nach Vernebelung der Schlacht- und Zerlegehalle mit einem kationischen Polymer aus der Gruppe der Guanidine

In Tabelle 29 ist zusammengefasst, welche Probenahmeorte in Betrieb C bei den zwei Beprobungen ein positives Ergebnis auf *C. estertheticum*-like Organismen ergaben.

Tabelle 29: Ergebnisse der PCR-Untersuchungen der beiden Beprobungen von Betrieb C für das Primerpaar 16SEF/16SER

Beprobte Stelle	1. Probennahme		2. Probennahme	
	A	B	A	B
1 Oberfläche Zerlegeband	-	+	-	+
2 Fünf Glieder des Zerlegebandes	-	+	/	/
3 Verbindungsgestänge des Zerlegebandes	+	+	/	/
4 Führungsrolle des Zerlegebandes	+	+	/	/
5 Eisengestänge über dem Zerlegeband	+	+	+	+
6 Zerlegebrett	+	+	-	-
7 Stoffhandschuh von Zerlegepersonal	+	+	/	/
8 Boden im Kühlageraum, Randbereich	+	-	+	+
9 Metallverkleidung der Wand im Kühlageraum	-	+	+	+
10 Gully im Kühlageraum	+	-	+	-
+ = positives Ergebnis - = negatives Ergebnis / = PCR nicht durchgeführt				

Die DNA-Extrakte, die in diesen Untersuchungen ein negatives Ergebnis lieferten, wurden in eine Amplifikationskontroll-PCR eingesetzt (Kapitel 3.2.2.3). Alle Amplifikationskontrollen waren positiv. Somit wurde die Amplifikation nicht inhibiert.

4.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Insgesamt wurden in den drei Betrieben 150 Tupferproben auf das Vorkommen von *C. estertheticum*, *C. estertheticum*-like Organismen, *C. bowmanii*, *C. frigoris* und *C. gasigenes* untersucht. Tabelle 30 zeigt, welche psychrophilen und psychrotoleranten Clostridien in den einzelnen Betrieben bei den jeweiligen Beprobungen nachgewiesen wurden.

Tabelle 30: Ergebnisse der verschiedenen Beprobungen von Betrieb A, B und C mit den fünf verschiedenen Primerpaaren

Betrieb	Probennahme	Anzahl positiver Proben				
		16SE- Primerpaar	EISR- Primerpaar	<i>C.</i> <i>bowmanii</i>	<i>C.</i> <i>frigoris</i>	<i>C.</i> <i>gasigenes</i>
A	1	15	13	0	7	0
	2	5	5	0	2	0
	3	3	2	0	2	0
	4	0	0	0	0	0
B	1	6	3	0	1	0
	2	0	0	0	0	0
C	1	15	15	0	3	12
	2	8	8	1	0	0
Insgesamt		52	46	1	15	12

5 DISKUSSION

Ende der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts wurden die ersten Fälle von Blown Pack Spoilage, einer Verderberscheinung, die durch kälteliebende Clostridien wie *C. estertheticum* verursacht wird, beobachtet. Dabei kommt es bei vakuumverpacktem Rindfleisch zu einem massiven Aufblähen der Verpackung aufgrund von starker Gasbildung und einem ekelerregenden, Buttersäure-ähnlichen Geruch. Seitdem trat diese Form des Verderbs mit zunehmender Häufigkeit auf. Inzwischen ist der Fleischverderb durch psychrotolerante Clostridien zu einem weltweiten Problem mit hohen finanziellen Verlusten für die Fleischindustrie geworden, da vor allem die hochwertigen Teilstücke wie Filet oder Roast Beef vom Blown Pack Spoilage betroffen sind.

Neben *C. estertheticum* wurden mit den sogenannten *Clostridium estertheticum*-like Organismen und *C. gasigenes* weitere Verursacher dieses Verderbsgeschehens identifiziert. In den letzten Jahren kamen eine Vielzahl an neuen psychrotoleranten Clostridienspezies hinzu (Moschonas et al., 2012; Shcherbakova et al., 2005; Spring et al., 2003; Suetin et al., 2009). Psychrophile Clostridien sind nicht ausschließlich auf konstant kalte Habitate wie etwa die Antarktis angewiesen, sondern können auf Grund ihrer äußerst widerstandsfähigen Dauerform, den Sporen, auch in saisonal kalten und nicht durchgehend anaeroben Bereichen überleben (Broda et al., 2009; Pond et al., 2006). Erst wenn die äußeren Umstände ideal für das Überleben der Mikroorganismen sind, gehen diese in ihre vegetative Form über und vermehren sich.

Wenn in einem fleischverarbeitenden Betrieb Sporen von psychrophilen Clostridien vorhanden sind und auf Fleisch gelangen, das im weiteren Verlauf vakuumiert und kühl gelagert wird, herrscht ein ideales Milieu für die Vermehrung der Mikroorganismen. Auf diese Weise kann es zum Auftreten von Blown Pack Spoilage und damit zur weiteren Verbreitung der Clostridiensporen innerhalb eines Betriebes oder von einem zum anderen Betrieb kommen. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Bedeutung von psychrophilen und psychrotoleranten Clostridien als Verderbserreger von gekühlten Lebensmitteln weitaus größer ist, als ursprünglich angenommen.

Der Begriff *C. estertheticum*-like Organismen wurde erstmals von Broda et al. (2002) verwendet. Damit wurden Bakterienstämme, die in Neuseeland von aufgeblähten,

vakuumverpackten Wildfleischproben isoliert wurden, bezeichnet. Die Sequenzierung der 16S rDNA Gen-Sequenz dieser Isolate ergab eine Übereinstimmung der Stämme mit *C. estertheticum* von 98,1 %, jedoch unterschieden sie sich in ihren phänotypischen und chemotaxonomischen Eigenschaften von *C. estertheticum*. Seit der Entwicklung des Primerpaares 16SEF/16SER durch Broda et al. (2003a) zum Nachweis von *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Organismen wurden weitere psychrophile Clostridienspezies entdeckt.

Laut Cavill et al. (2011) und Brightwell et al. (2012) unterscheidet sich die Gensequenz von einigen dieser neuen Spezies nur geringfügig von der Gensequenz des Primerpaares 16SEF/16SER. Grund hierfür ist die enge phylogenetische Verwandtschaft einer Vielzahl psychrotoleranter Clostridien. So ist etwa *C. frigoris* sehr eng mit *C. estertheticum* verwandt (Cavill et al., 2011; Suetin et al., 2009). Aus diesem Grund ist laut Cavill et al. (2011) die alleinige Anwendung dieses Primerpaares zum Nachweis von *C. estertheticum* nicht ausreichend, denn es ist mit hoher Wahrscheinlichkeit zu unspezifisch.

In den Vorversuchen zu der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass mit dem Primerpaar 16SEF/16SER *C. bowmanii* und *C. frigoris* erfasst werden können. Auch Brightwell et al. (2012) beschreiben die Nachweisbarkeit von *C. bowmanii* mit diesem Primerpaar. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine spezielle Methode zum Nachweis von *C. bowmanii* und *C. frigoris* entwickelt. Somit können Proben, die im PCR-Nachweis mittels 16SE-Primerpaar positiv auf *C. estertheticum*-like Organismen getestet worden sind, durch die neu entwickelten PCR-Systeme genauer differenziert werden.

Die PCR-Methode zum Nachweis von *C. gasigenes* von Broda et al. (2003a) wurde durch die Entwicklung des neuen Primers CGr (Zitzlmann, persönliche Mitteilung, 2009) modifiziert und im Anschluss neu validiert.

Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit ein Vergleich der konventionellen Gelelektrophorese und der relativ neuen „Lab-on-a-chip“-Technologie am Beispiel des Experion Automated Electrophoresis Systems (Biorad) vorgenommen. Dabei wurde untersucht, ob sich beide Methoden zum Nachweis von PCR-Produkten hinsichtlich der Nachweisgrenze voneinander unterscheiden.

Bisherige Untersuchungen zum Vorkommen und der Verbreitung von kälteliebenden Clostridien in fleischverarbeitenden Betrieben beschränkten sich auf *C. estertheticum* und *C. gasigenes* (Broda et al., 2009; Moschonas et al., 2009) sowie *C. algidicarnis* und *C. putrefaciens* (Broda et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden drei europäische fleischverarbeitende Betriebe unterschiedlicher Struktur auf das Vorkommen von *C. estertheticum*, *C. estertheticum*-like Organismen, *C. gasigenes*, *C. bowmanii* und *C. frigoris* untersucht.

Zusätzlich wurde in den Betrieben die Wirksamkeit unterschiedlicher Reinigungs- und Desinfektionsverfahren gegen diese psychrotoleranten Clostridien getestet. Zwei der fleischverarbeitenden Betriebe wurden jeweils einmal vor und einmal nach der Anwendung von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen beprobt. Ein Betrieb wurde insgesamt zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt, von der Ausgangssituation über die Einführung eines verbesserten Desinfektionsverfahrens bis hin zur Grundsanierung und Erfolgskontrolle.

Broda (2007) geht davon aus, dass psychrophile Clostridien in fleischverarbeitenden Betrieben in Form von Sporen auftreten müssen, da sie nur in dieser Vegetationsform die aeroben und zum Teil zu warmen Umstände überdauern können. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst Inokulationsversuche durchgeführt, um die Nachweisbarkeit von Clostridiensporen mittels Wattetupferproben von verschiedenen Oberflächen zu überprüfen.

Vergleich psychrotoleranter Clostridium spp.

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs psychrotolerante Clostridien hinsichtlich Inkubationsdauer bis zum ersten Auftreten von Koloniewachstum, Koloniemorphologie, Hämolysevermögen auf Columbia Blutagar und Morphologie der vegetativen Zellen näher untersucht und die Ergebnisse miteinander und mit den Ergebnissen aus vorangegangenen Arbeiten verglichen.

CEE und CEL wiesen dabei nur geringe Unterschiede in Bezug auf die Dauer bis zum Koloniewachstum nach Inkubationsbeginn und der Größe der Kolonien sowie der vegetativen Zellen auf.

Bei einer Inkubationstemperatur von +10 °C zeigte CEE nach neun Tagen, CEL nach elf Tagen erstes Koloniewachstum. Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Zeit bis zum Auftreten des ersten Koloniewachstums der beiden Keime könnte die

verwendete Inkubationstemperatur sein. Das Wachstumsoptimum für CEE liegt mit +6 - +8 °C (Spring et al., 2003) deutlich näher an der Inkubationstemperatur von +10 °C als das mit +15 °C angegebene Wachstumsoptimum von CEL (Spring et al., 2003). Da bisher die eindeutige Zuordnung der beiden Subspezies von *C. estertheticum* noch nicht zweifelsfrei geklärt zu sein scheint (Böhm, 2013; Yang et al. 2009a; Yang et al., 2010a), wurde die Inkubationstemperatur der beiden Mikroorganismen in der vorliegenden Arbeit analog zu vorangegangenen Studien zu *C. estertheticum* bei +10 °C festgelegt (Boerema et al., 2003; Broda et al., 2003a; Broda, 2007).

CEE zeigte nach 11 Tagen β -Hämolyse auf CBA, CEL nach 13 Tagen. Damit stimmen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen von Yang et al. (2010a) überein, die zu dem Schluss kamen, dass beide Subspezies die Fähigkeit zur β -Hämolyse besitzen. Spring et al. (2003) konnten dagegen keine β -Hämolyse bei CEE (DSMZ 8809) nachweisen. In den Untersuchungen von Ziegler (2009) dagegen zeigte CEE (DSMZ 8809) deutliche β -Hämolyse auf CBA. Ziegler (2009) isolierte aus Verdachtsproben von vakuumverpacktem Rindfleisch zwei *C. estertheticum*-Isolate. Eines dieser Isolate wies β -Hämolyse auf CBA auf, das andere nicht. Die Koloniemorphologie dieser beiden Isolate war ansonsten jedoch identisch. Da mit dem in dieser Studie angewendeten PCR-System nach Broda et al. (2003a) und dem Primerpaar EISRF/EISRR eine Unterscheidung zwischen den beiden Subspezies von *C. estertheticum* nicht möglich ist, lässt sich nicht sagen, welcher Subspezies die von Ziegler (2009) isolierten Stämme angehörten. Eine Unterteilung der beiden Subspezies von *C. estertheticum* allein auf Grund ihres Hämolysevermögens wie bei Moschonas et al. (2009) muss als nicht mehr ausreichend angesehen werden.

Endgültige Gewissheit über die Verschiedenheit der beiden Subspezies könnte die vollständige Sequenzierung des Genoms der beiden Bakterienstämme erbringen.

Der Bakterienstamm C 194, ein *C. estertheticum*-like Organismus (Ziegler, 2009), zeigte in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit deutliche morphologische Unterschiede zu CEE und CEL. Die Kolonien waren glattrandig und von beiger Farbe, wobei die Ränder einen schmalen durchsichtigen Ring aufwiesen. Sie zeigten keine Hämolyse auf CBA. Die vegetativen Zellen waren deutlich kleiner als die von

CEE und CEL. Desweiteren wiesen die Stäbchen im vorderen Drittel deutliche Einschnürungen auf, die den anderen beiden Bakterienstämmen fehlten.

Der Begriff „*Clostridium estertheticum*-like Organismen“, der ursprünglich von Broda et al. (2002) eingeführt wurde, um zwei Bakterienstämme zu bezeichnen, die von aufgeblähten Wildfleischproben in Neuseeland isoliert wurden, umfasst vermutlich eine Vielzahl unterschiedlicher psychrotoleranter Clostridienstämme. Laut Cavill et al. (2011) genügt die alleinige Anwendung des von Broda et al. (2003a) entwickelten Primerpaares 16SEF/16SER nicht, um den Nachweis von *C. estertheticum* zu erbringen, da seit dessen Entwicklung eine Reihe neuer psychrophiler Clostridienspezies entdeckt wurden, die zu Kreuzreaktionen mit dem Primerpaar 16SEF/16SER führen könnten. Die Ergebnisse der Vorversuche zu den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Annahme, denn bei Anwendung des PCR-Systems nach Broda et al. (2003a) mit dem Primerset 16SE wurde ein positives Signal mit einer Länge von 790 Basenpaaren bei Einsetzen der DNA von CEE, CEL, *C. estertheticum*-like Isolat C 194 sowie von *C. bowmanii* und *C. frigoris* erzeugt.

Die Untersuchungen von Cavill et al. (2011) und von Brightwell et al. (2012) ergaben, dass die 16S rDNA von *C. bowmanii* nur eine zusätzliche Base sowie eine Basenabweichung am 5'-Ende des 16SEF-Primers sowie eine einzige Basenabweichung in der Mitte des 16SER-Primers aufwies. *C. lacusfryxellense* hat nur eine zusätzliche Base am 5'-Ende des 16SEF-Primers und *C. frigorophilum* zwei zusätzliche Basen am 5'-Ende des 16SEF-Primers.

Mit dem von Brightwell et al. (2012) entwickelten real-time PCR-Ansatz werden neben *C. estertheticum* auch die beiden in Neuseeland von vakuumverpacktem Wildfleisch isolierten *C. estertheticum*-like Stämme K21 und K24 (Broda et al., 2000a) sowie *C. bowmanii* und *C. lacusfryxellense* erfasst. Der spezifische Nachweis von *C. estertheticum* bleibt laut Brightwell et al. (2012) eine Herausforderung. Um genauere Erkenntnisse über die sogenannten *C. estertheticum*-like Organismen zu erlangen, müssten weitere Untersuchungen von isolierten Stämmen, ggf. mit Gensequenzanalyse, stattfinden.

C. frigoris weist laut Cavill et al. (2011) eine enge phylogenetische Verwandtschaft zu *C. estertheticum* auf. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden

deutliche morphologische Unterschiede des Keims zu *C. estertheticum* festgestellt. Das erste Koloniewachstum fand nach 14 Tagen bei einer Inkubationstemperatur von +5 °C statt. Die Koloniemorphologie von *C. frigoris* wies Ähnlichkeit mit der des *C. estertheticum*-like Isolats C 194 auf, jedoch waren die Einzelkolonien von *C. frigoris* wesentlich kleiner. Der Keim zeigte keine Hämolyse auf CBA. Die vegetativen Zellen von *C. frigoris* wiesen im Rasterelektronenmikroskop keine Einschnürungen im vorderen Drittel wie bei C 194 auf.

In der vorliegenden Arbeit kommt es zu abweichenden Ergebnissen der Beschreibung von *C. frigoris* durch Spring et al. (2003) hinsichtlich der Größe der Einzelkolonien und der vegetativen Zellen. Spring et al. (2003) beschreiben den Durchmesser der Einzelkolonien mit 1-2 mm, die Größe der vegetativen Zellen von *C. frigoris* mit 1,4-1,8 µm x 2,2-5,0 µm. In der vorliegenden Arbeit erreichten die Einzelkolonien eine Größe von 0,5-1 mm, die vegetativen Zellen hingegen waren 0,8-1,5 µm x 2,3-11,5 µm groß. Der Größenunterschied der Einzelkolonien könnte mit den unterschiedlichen Inkubationszeiten zusammen hängen. Während Spring et al. (2003) diese mit 14-30 Tagen angibt, wurde *C. frigoris* in der vorliegenden Arbeit nur 20 Tage anaerob inkubiert, weshalb die Einzelkolonien kleiner sein könnten als bei Spring et al. (2003). Die abweichenden Größenangaben der vegetativen Zellen sind damit aber nicht erklärbar.

C. bowmanii und *C. gasigenes* zeigten keine auffälligen Gemeinsamkeiten mit den übrigen Bakterienstämmen.

Das erste Koloniewachstum von *C. bowmanii* begann nach 7 Tagen bei +15 °C, die Kolonien zeigten keine Hämolyse auf CBA. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit der Beschreibung von *C. bowmanii* durch Spring et al. (2003) überein.

C. gasigenes ist der einzige psychrotrophe Vertreter, der in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht wurde. Er gilt nach *C. estertheticum* als der zweithäufigste Verursacher von Blown Pack Spoilage bei vakuumverpacktem Fleisch. Der Keim zeigte schnelles Koloniewachstum nach bereits 4 Tagen bei +20 °C. Auf CBA zeigte *C. gasigenes*, im Gegensatz zu den Untersuchungen von Broda et al. (2000c) und Moschonas et al. (2009) keine Hämolyse. Broda et al. (2000c) beschreiben den Durchmesser der Einzelkolonien mit 0,7-3 mm, die Größe der vegetativen Zellen von *C. gasigenes* mit 0,4 µm x 2,0-7,5 µm. In der vorliegenden Arbeit erreichten die Einzelkolonien eine Größe von 1-2 mm, die vegetativen Zellen hingegen waren 0,4-

1,2 µm x 1,9-11,5 µm groß. Im Rasterelektronenmikroskop waren deutliche Fortsätze im letzten Drittel an den geraden Stäbchen erkennbar. Nach derzeitigem Kenntnisstand wurden diese Fortsätze bisher in keiner Veröffentlichung beschrieben. Um mehr Erkenntnisse über die Funktion dieser Fortsätze zu erhalten sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

PCR-Entwicklung zum Nachweis von *C. bowmanii* und *C. frigidus*

In der vorliegenden Arbeit wurde jeweils ein neues PCR-System zum Nachweis von *C. bowmanii* sowie von *C. frigidus* entwickelt. Die Spezifität der hierfür entwickelten Primerpaare CBf/CBr sowie CFf/CFr wurde überprüft, indem die DNA von 55 verschiedenen Keimen (Tabelle 15) in die jeweiligen PCR-Systeme eingesetzt wurde. Die Auswahl dieser Bakterienstämme erfolgte in Anlehnung an Broda et al. (2003a) zur Überprüfung der Spezifität der Primersets 16SE, 16SDB und EISR. Zusätzlich wurden weitere Fleisch- bzw. Rind-assoziierte Keime sowie weitere psychrotolerante Clostridien in die Untersuchungen mit einbezogen, denn seit der Entwicklung der Primersets durch Broda et al. (2003a) sind laut Cavill et al. (2011) mehrere neue psychrophile Clostridienstämme entdeckt worden.

Das Primerpaar CBf/CBr erzeugte ausschließlich bei Einsetzen der DNA von *C. bowmanii* (DSMZ 14206) eine Bande mit einer Länge von 808 Basenpaaren. Das Primerpaar CFf/CFr erzeugte ausschließlich bei Einsetzen der DNA von *C. frigidus* (DSMZ 14204) eine Bande mit einer Länge von 685 Basenpaaren.

Die Überprüfung der Spezifität der beiden Primerpaare wurde nicht in Inklusivität und Exklusivität getrennt, da es während der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit nicht möglich war, weitere Isolate von *C. bowmanii* und *C. frigidus* zu erhalten.

Um zu klären, ob die beiden PCR-Systeme die jeweiligen Keime zuverlässig detektieren, sind weiterführende Untersuchungen mit zusätzlichen Isolaten des jeweiligen Stammes notwendig.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der PCR-Methoden wurden die Keimzahlen der als Inokulum verwendeten Kulturen in Anlehnung an Ziegler (2009) mittels direkter Zellzählung mit Thoma-Kammer ermittelt. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels High Pure PCR Template Preparation Kit der Firma Roche mit den aus Tabelle 16 angewendeten Modifizierungen. Die Modifizierungen wurden als notwendig erachtet, da in den Standardprotokollen zur DNA-Extraktion dieses Kits ein Zwischenschritt zur

mechanischen Aufbereitung des Probenmaterials, insbesondere um die Sporenhülle psychrotoleranter Clostridien zu knacken, fehlt.

Die Nachweisgrenze der PCR-Reaktionen wurde für vegetative Zellen und für Sporen aus künstlich kontaminiertem Fleischtropfsaft bestimmt (vgl. Ziegler, 2009).

Vegetative Zellen von *C. bowmanii* konnten dabei bei Anwendung der konventionellen Gelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Produkte im Bereich von 10^3 Organismen/ml Fleischtropfsaft nachgewiesen werden. Bei Anwendung des Experion Automated Electrophoresis System mit vorangehender Aufreinigung der PCR-Produkte lag die Nachweisgrenze bei 10^4 Organismen/ml.

Vegetative Zellen von *C. frigidus* konnten bei Anwendung der konventionellen Gelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Produkte im Bereich von 10^3 Organismen/ml Fleischtropfsaft nachgewiesen werden. Bei Anwendung des Experion Automated Electrophoresis System mit vorangehender Aufreinigung der PCR-Produkte lag die Nachweisgrenze ebenfalls bei 10^3 Organismen/ml.

Die PCR-Produkte wurden vor deren Einsetzen in das Experion Automated Electrophoresis System mittels NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey und Nagel) aufgereinigt, um eventuell vorhandene inhibitorische Substanzen, die zu Störungen dieser „Lab-on-a-chip“-Technologie führen könnten, zu entfernen.

Die Nachweisgrenze für Sporen von *C. bowmanii* konnte nicht ermittelt werden, da es während der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit nicht gelang, eine Sporensuspension des Keims herzustellen.

Weder eine einjährige Inkubation des Keims bei +15 °C unter Verwendung des Sporenmediums nach Peck et al. (1992), noch eine Inkubation bei +15 °C für vier Monate unter Verwendung des modifizierten DSMZ Mediums 63 (Spring et al., 2003) erbrachte eine Sporensuspension von *C. bowmanii*. Auch bei den Untersuchungen von Spring et al. (2003) wurde nur eine niedrige Sporenausbeute für *C. bowmanii* erzielt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Keim eine niedrige Neigung zur Sporenbildung aufweist. Auf diesem Gebiet sind weitere Untersuchungen notwendig, um Anwendungsfehler auszuschließen und Ursachen für die Befunde zu finden. Sollte sich die Annahme der geringeren Versporungsneigung von *C. bowmanii* bestätigen, ergeben sich daraus eventuell Möglichkeiten, um die Verbreitung von psychrophilen Clostridien einzudämmen, da die Verbreitung der Keime in den

Betrieben vermutlich hauptsächlich in Form von Sporen erfolgt (Broda, 2007) und psychrophile Clostridien eine enge phylogenetische Verwandtschaft aufweisen (Cavill et al., 2011).

Sporen von *C. frigoris* konnten bei Anwendung der konventionellen Gelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Produkte im Bereich von 10^5 Organismen/ml Fleischtropfsaft nachgewiesen werden. Bei Anwendung des Experion Automated Electrophoresis System ohne Aufreinigung der PCR-Produkte lag die Nachweisgrenze ebenfalls bei 10^5 Organismen/ml.

Um falsch negative Ergebnisse bei der Nachweisgrenze der PCR-Systeme verursacht durch PCR-Inhibitoren auszuschließen, wurde in Anlehnung an Böhm (2013) mit allen DNA-Proben, die aus dem beimpften Tropfsaft gewonnen wurden, eine externe Amplifikationskontrolle nach Gallien et al. (1997) durchgeführt. Diese verlief in allen Fällen positiv.

PCR-Entwicklung zum Nachweis von *Clostridium gasigenes*

Das von Broda et al. (2003a) entwickelte PCR-System zum Nachweis von *C. gasigenes* mit dem Primerset 16SDB wurde in der vorliegenden Arbeit modifiziert. Dazu wurde ein neuer Primer entwickelt (CGr), der mit dem von Broda et al. (2003a) entwickelten Primer 16SDBF kombiniert wurde. Es wurde eine Hot Taq Polymerase (Peqlab) verwendet.

Bei der Überprüfung der Spezifität des PCR-Systems wurde analog zu dem Vorgehen bei *C. bowmanii* und *C. frigoris* verfahren.

Die Keimzahlbestimmung der als Inokulum verwendeten Kulturen sowie die DNA-Extraktion erfolgte ebenfalls wie bereits für *C. bowmanii* und *C. frigoris* beschrieben. Das Primerpaar 16SDBF/CGr bildete ausschließlich bei Einsetzen der DNA von *C. gasigenes* in das PCR-System eine Bande mit einer Länge von 550 Basenpaaren. Um den zuverlässigen Nachweis von *C. gasigenes* mit diesem Primerset zu garantieren, sollten zusätzliche Untersuchungen angestellt werden, bei denen weitere Isolate des Keims in das PCR-System eingesetzt werden.

Die Nachweisgrenze der PCR-Reaktion wurde für vegetative Zellen und für Sporen aus künstlich kontaminiertem Fleischtropfsaft bestimmt (Ziegler, 2009).

Vegetative Zellen von *C. gasigenes* konnten dabei bei Anwendung der konventionellen Gelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Produkte im Bereich von 10^1 Organismen/ml Fleischtropfsaft nachgewiesen werden. Bei Anwendung des Experion Automated Electrophoresis System mit vorangehender Aufreinigung der PCR-Produkte lag die Nachweisgrenze bei 10^3 Organismen/ml.

Sporen von *C. gasigenes* konnten bei Anwendung der konventionellen Gelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Produkte im Bereich von 10^2 Organismen/ml Fleischtropfsaft nachgewiesen werden. Bei Anwendung des Experion Automated Electrophoresis System ohne Aufreinigung der PCR-Produkte lag die Nachweisgrenze ebenfalls bei 10^2 Organismen/ml.

Das PCR-System zum Nachweis von *C. gasigenes* weist eine sehr hohe Sensitivität auf. Ein Grund für die verbesserte Nachweisgrenze könnte in der Anwendung des neuen Primers CGr liegen. Die Nachweisgrenze für das Primerpaar 16SDBF/16SDBR von Broda et al. (2003a) liegt für vegetative Zellen von *C. gasigenes* vor Anreicherung bei 10^4 Organismen/ml.

Ein weiterer Grund könnte in der Verwendung der Hot Taq Polymerase liegen. Bei der Validierung des vorliegenden PCR-Systems wurde eine Hot Taq Polymerase angewendet, die bei Raumtemperatur inaktiv ist, so dass sämtliche Komponenten des PCR-Reaktionsansatzes ungekühlt pipettiert werden konnten, ohne dass es zu Fehlbindungen der Primer kommen konnte. Laut Chou et al. (1992) konkurrieren derartige Fehlbindungen bei der Amplifikation mit der eigentlichen Zielsequenz, so dass die Effizienz der Amplifikation der Zielsequenz deutlich reduziert werden kann.

Das Vorliegen eines Fehlers bei der Auszählung der Organismen zur Bestimmung der Nachweisgrenze wird ausgeschlossen, da sowohl bei den Versuchen zur Bestimmung der Sensitivität der vegetativen Keime als auch bei jenen zur Bestimmung der Nachweisgrenze der Sporen jeweils drei gesonderte Versuchsdurchgänge durchgeführt wurden.

In weiterführenden Untersuchungen sollten die PCR-Systeme zum Nachweis von *C. bowmanii* und *C. frigoris* ebenfalls unter Anwendung einer Hot Taq Polymerase durchgeführt werden, da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hindeuten, dass dabei ebenfalls deutlich höhere Nachweisgrenzen erzielt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Nachweisgrenzen verschiedener PCR-Systeme aus Fleischtropfsaft bestimmt. Nach Brightwell et al. (2012) sind die Nachweisgrenzen auch von den untersuchten Medien abhängig. Laut Brightwell et al. (2012) ist der Nachweis von *C. estertheticum* aus Fleisch und Wasser relativ einfach, da die Keime dort meist in ihrer vegetativen Form vorliegen. Der Nachweis aus Fäzes und Oberflächenproben ist dagegen schwieriger, da *C. estertheticum* in diesen Medien meist in Sporenform vorliegt und eine Vielzahl von PCR-Inhibitoren vorhanden sind. Durch eine Anreicherung der Proben vor der Untersuchung können die Organismen in ihre vegetative Form übergehen und die inhibierenden Substanzen werden verringert.

Vergleich der konventionellen Gelelektrophorese und des Experion Gerätes

Die Vorteile der „Lab-on-a-chip“-Technologie gegenüber der konventionellen Gelelektrophorese sind vielfältig. Die PCR-Fragmente werden genau und schnell analysiert. Die Laufzeit für das Experion Electrophoresis System beträgt 30 Minuten (Chang et al., 2010; Konrad und Busch, 2010). Außerdem benötigt man deutlich weniger Probenmaterial und der Einsatz von giftigen Reagenzien wie Ethidiumbromid wird reduziert bzw. entfällt (Konrad und Busch, 2010). Durch den automatisierten Prozess verringert sich zudem das Auftreten von Anwendungsfehlern.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bei Anwendung der konventionellen Gelelektrophorese und des Experion Systems bei der Ermittlung der Nachweisgrenze der verschiedenen PCR-Systeme ist nicht möglich, da die DNA bei der Ermittlung der Nachweisgrenze der vegetativen Zellen vor dem Einsetzen in das Experion Automated Electrophoresis System mit dem NucleoSpin Gel & PCR Clean-Up Kit (Macherey & Nagel) aufgereinigt wurde.

Die PCR-Produkte für das Experion System wurden aufgereinigt, um das Auftreten von unspezifischen Nebenbanden, sogenannten Ghost Bands, zu minimieren. Wie aus Abbildung 26 (Kapitel 4.2.3) hervor geht, bei der auf eine Aufreinigung der PCR-Produkte verzichtet wurde, detektiert das empfindliche Experion System diese unspezifischen Nebenbanden, wohingegen bei Abbildung 24 (Kapitel 4.2.3) das Auftreten der Ghost Bands durch vorangegangene Aufreinigung verhindert wurde.

Zudem wurde jeweils eine gesonderte PCR-Reaktion für den Einsatz in die Gelelektrophorese und in das Experion Automated Electrophoresis System

durchgeführt. Da die Versuche jeweils im Dreifachansatz durchgeführt wurden, kann trotzdem von soliden Ergebnissen ausgegangen werden.

Bei der vorliegenden Arbeit wurden den Untersuchungen zur Detektion der Nachweisgrenzen der Sporen der verschiedenen Keime eine Reihe von Vorversuchen vorangestellt, in denen das Auftreten von DNA-Verlust bei der Aufreinigung mittels verwendetem NucleoSpin Gel & PCR Clean-Up Kit (Macherey & Nagel) überprüft worden ist. Dabei wurde in jeweils einem Versuchsdurchgang pro Keim auf die Aufreinigung der PCR-Produkte aus den vegetativen Keimen vor dem Einsetzen in das Experion Automated Electrophoresis System verzichtet und die Ergebnissen mit denen aus der Ermittlung der Nachweisgrenze der vegetativen Zellen der verschiedenen PCR-Systeme verglichen.

Bei den Vorversuchen wurde festgestellt, dass die Aufreinigung der PCR-Produkte vor Einsatz in das Experion Automated Electrophoresis System zu abweichenden Ergebnissen bezüglich der Nachweisgrenze führt. Ohne Aufreinigung wurden vegetative Zellen von *C. bowmanii* bis 10^3 Organismen/ml nachgewiesen, damit entsprach das Ergebnis dem der Gelelektrophorese. Dagegen konnten vegetative Zellen von *C. bowmanii* mit Aufreinigung der PCR-Produkte nur bis 10^4 Organismen/ml nachgewiesen werden. Vegetative Zellen von *C. frigoris* wurden ohne Aufreinigung bis 10^2 Organismen/ml nachgewiesen, damit war das Ergebnis besser als bei Durchführung der Gelelektrophorese (10^3 Organismen/ml, Kapitel 4.2.2). Mit Aufreinigung der PCR-Produkte lag der Nachweis für *C. frigoris* bei 10^3 Organismen/ml. Auch bei den vegetativen Zellen von *C. gasigenes* hat die Aufreinigung der PCR-Produkte zu einer verminderten Nachweisgrenze im Experion Automated Electrophoresis System geführt. Ohne Aufreinigung der PCR-Produkte lag die Nachweisgrenze beim Vorversuch im Experion Automated Electrophoresis System bei 10^1 Organismen/ml, was ebenfalls der Nachweisgrenze mittels Gelelektrophorese entspricht (Kapitel 4.2.3), mit Aufreinigung der PCR-Produkte wurden vegetative Zellen von *C. gasigenes* dagegen bis 10^3 Organismen/ml nachgewiesen.

Es scheint bei der Aufreinigung der PCR-Produkte zum Verlust von DNA zu kommen. Aus diesem Grund wurde bei den Versuchen zur Ermittlung der Nachweisgrenze von Sporen von *C. frigoris* und *C. gasigenes* auf die Aufreinigung der PCR-Produkte verzichtet. Daraufhin wurden in der Gelelektrophorese und dem Experion System annähernd gleich gute Nachweisgrenzen erzielt (Kapitel 4.2.2 und 4.2.3).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es bei Aufreinigung der PCR-Produkte mittels NucleoSpin Gel & PCR Clean-Up Kit (Macherey & Nagel) zum Auftreten von DNA-Verlust kommt. Dadurch kann das Experion Automated Electrophoresis System zu schlechteren Ergebnissen als die konventionelle Gelelektrophorese führen. Wird auf eine Aufreinigung der PCR-Produkte verzichtet, führen beide Methoden zu gleich guten Ergebnissen.

Um weitere Erkenntnisse zu erlangen, inwiefern das Auftreten von DNA-Verlust die Ergebnisse des Experion Automated Electrophoresis System beeinflusst, sollten weitere Versuche unter Einbeziehung verschiedener Aufreinigungskits Gegenstand zukünftiger Forschungen sein.

Psychrotolerante *Clostridium* spp. in fleischverarbeitenden Betrieben

Inokulationsversuche

Die Inokulationsversuche wurden durchgeführt um zu überprüfen, ob die Methode der vorliegenden Arbeit zum Nachweis von Sporen von psychrotoleranten Clostridien in fleischverarbeitenden Betrieben geeignet ist.

Es wurde untersucht, ob Sporen von CEE mittels eines sterilen Wattetupfers von Oberflächen aufgenommen werden können und nach Anreicherung mit dem PCR-System nach Broda et al. (2003a) mit den Primerpaaren 16SEF/16SER und EISRF/EISRR nachweisbar sind. Dabei wurden zwei unterschiedliche Oberflächenmaterialien verwendet (Kunststoff und Edelstahl), die in der Fleischindustrie häufig zum Einsatz kommen. In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob der Nachweis der Clostridiensporen mit dieser Methode auch von einer gefurchten Kunststoffoberfläche möglich ist. Durch die Furchen im Kunststoff sollte der gebrauchte Zustand des Materials simuliert werden und somit eine realistische Materialbeschaffenheit, wie sie im fleischverarbeitenden Betrieb anzutreffen ist, erzielt werden.

Mit beiden Primerpaaren wurden Sporen von CEE sowohl auf glatten, als auch auf gefurchten Kunststoffplättchen sowie auf Edelstahlplättchen nachgewiesen. Die Intensität der Banden fiel dabei bei glatter Kunststoffoberfläche sowie bei Edelstahlplättchen annähernd gleich gut aus. Bei den eingekerbten Kunststoffplättchen dagegen nahm die Intensität der Banden deutlich ab (Abbildung 27 und Abbildung 28). Zudem wurde mit dem Primerset EISRF/EISRR und dem

PCR-System nach Broda et al. (2003a) bei den eingeritzten Kunststoffplättchen eine geringere Bandenintensität erzielt als bei Anwendung des 16SEF/16SER Primerpaares. Auch bei den Untersuchungen von Ziegler (2009) war die Bandenintensität des EISR-Primerpaares deutlich schwächer als die des 16SE-Primerpaares, obwohl die Nachweisgrenze für Sporen von *C. estertheticum* von Ziegler (2009) für beide Primerpaare mit 10^3 Organismen/ml Tropfsaft angegeben wird.

Mit der in der vorliegenden Arbeit angewendeten Methode ist ein Nachweis von Sporen von CEE möglich, wobei die Oberflächenqualität großen Einfluss auf die Detektierbarkeit der Clostridiensporen zu haben scheint. Dies ist im Hinblick auf die Auswertung der Ergebnisse aus den Betriebsbeprobungen von entscheidender Bedeutung: Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es an einigen Probenahmestellen zu falsch negativen Ergebnissen kam, weil eine Aufnahme der vorhandenen Sporen mittels Wattetupfer nicht erfolgreich war. Ein Grund für die mangelhafte Aufnahmefähigkeit der Wattetupfer bei gefurchten Kunststoffoberflächen könnte sein, dass die Tupfer die sich tief in den Kerben des Materials befindenden Sporen nicht erreichen.

Durch die in der vorliegenden Arbeit angewendete Methode lassen sich Sporen von *C. estertheticum* von verschiedenen Oberflächen nachweisen. Es sollte jedoch darauf geachtet werden, dass die Wattetupfer nach der Probenahme über einen ausreichend langen Zeitraum bei dem jeweiligen Wachstumsoptimum des zu detektierenden Keims angereichert werden, damit die vermutlich geringen Mengen an aufgenommenen Sporen in ihre vegetative Form übergehen, sich vermehren und damit nachweisbar werden. Auch Brightwell et al. (2012) beschrieben, dass sich der Nachweis von Clostridien, die zu Blown Pack Spoilage führen können aus Oberflächenproben schwierig gestaltet. Da die Organismen hier meist in Sporenform vorliegen, sollten sie laut Brightwell et al. (2012) erst angereichert werden, um sie nicht nur in ihre vegetative Form zu überführen, sondern auch um mögliche inhibitorische Substanzen in der Oberflächenprobe zu minimieren.

Die Inokulationsversuche wurden ausschließlich mit dem PCR-System nach Broda et al. (2003a) und den Primerpaaren 16SEF/16SER und EISRF/EISRR durchgeführt. Die Nachweisgrenze des PCR-Systems nach Broda et al. (2003) für Sporen von *C. estertheticum* liegt bei 10^3 Organismen/ml (Ziegler, 2009). Die Nachweisgrenze für

Sporen von *C. gasigenes* liegt bei dem in dieser Arbeit entwickelten PCR-System bei 10^2 Organismen/ml, weshalb davon auszugehen ist, dass *C. gasigenes* mit der in der vorliegenden Arbeit angewendeten Methode mindestens gleich gut von derartigen Oberflächen nachgewiesen werden kann. Die Nachweisgrenze für Sporen von *C. frigor* hingegen liegt bei dem in dieser Arbeit entwickelten PCR-System bei 10^5 Organismen/ml und ist damit deutlich schlechter, weshalb es möglich ist, dass der Sporennachweis von *C. frigor* von Oberflächen mit der in der vorliegenden Arbeit angewendeten Methode weniger sensitiv ausfällt. Für das PCR-System zum Nachweis von *C. bowmanii* konnte in diesen Untersuchungen keine Nachweisgrenze für Sporen ermittelt werden. *C. bowmanii* wurde bei den Betriebsbeprobungen nur einmal nachgewiesen. Diese geringe Nachweishäufigkeit könnte entweder dafür sprechen, dass das PCR-System nicht sensitiv genug für den Nachweis von *C. bowmanii*-Sporen von Oberflächen ist, oder dass *C. bowmanii* allgemein selten in fleischverarbeitenden Betrieben aufzufinden ist.

Um zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit erstellten PCR-Systeme tatsächlich zu einer ähnlich guten Nachweisbarkeit von Sporen von *C. gasigenes* und *C. frigor* von Oberflächen führen, sollten in weiterführenden Untersuchungen die Inokulationsversuche mit den neu entwickelten PCR-Systemen durchgeführt werden.

Betriebe A, B und C

In der vorliegenden Arbeit wurden drei fleischverarbeitende Betriebe unterschiedlicher Größe und Struktur auf das Vorkommen von psychrophilen und psychrotoleranten Clostridien untersucht. Ziel war es, mögliche Kontaminationsstellen der Keime im Betrieb zu identifizieren sowie aus den Ergebnissen geeignete Sanierungs- und Präventionsmaßnahmen abzuleiten.

Es wurden zwei deutsche Handwerksbetriebe mit und ohne eigener Schlachtung sowie ein Schlacht- und Zerlegebetrieb im europäischen Ausland untersucht. In allen drei Betrieben traten Probleme mit Blown Pack Spoilage erstmals im Zeitraum Ende 2008 bis Anfang 2009 auf. Die Lagerungsdauer der Ware bis zu den ersten Anzeichen von Blown Pack Spoilage betrug zwischen zwei und vier Wochen.

Das tägliche Hygienemanagement beschränkte sich bei Betrieb A auf die Anwendung eines Dampfstrahlers, zusätzlich verwendete Betrieb A einmal wöchentlich einen

Schaumreiniger, dabei im wöchentlichen Wechsel alkalisch und sauer. Die Arbeitsmaschinen wurden nach Bedarf mit einem neutralen Reinigungskonzentrat behandelt.

Das tägliche Hygienemanagement von Betrieb A muss als ungenügend beurteilt werden. Weder erfolgte eine gründliche tägliche Reinigung, noch erfolgte eine sich daran anschließende Desinfektion. Diese unzureichende Betriebshygiene spiegelte sich bei der Beurteilung der Ausgangssituation des Betriebes während der ersten Probenahme wieder. Der subjektive Eindruck der Betriebshygiene in Betrieb A erschien schlecht, da makroskopische Verunreinigungen der Gerätschaften erkennbar waren.

Das tägliche Hygienemanagement von Betrieb B bestand aus einer Vorreinigung mittels Dampfstrahler sowie eines im Anschluss daran eingesetzten alkalischen Schaumreinigers mit Aktivchlor, wobei dieser alle 2-3 Wochen durch einen sauren Schaumreiniger ersetzt wurde. Zusätzlich erfolgte einmal wöchentlich eine Flächendesinfektion mit einem neutralen Desinfektionsmittel.

Das tägliche Hygienemanagement von Betrieb B wird als befriedigend beurteilt. Der Einsatz eines Desinfektionsmittels sollte täglich erfolgen. Dennoch war der subjektive Eindruck der Betriebshygiene in Betrieb B während der ersten Probenahme sehr gut, da keine makroskopisch erkennbaren Verunreinigungen der Gerätschaften und der Einrichtung festgestellt wurden.

Das tägliche Hygienemanagement von Betrieb C bestand ebenso wie in Betrieb B aus einer Vorreinigung mittels Dampfstrahler sowie im Anschluss daran dem Einsatz eines alkalischen Schaumreinigers mit Aktivchlor, jedoch verwendete Betrieb C einmal wöchentlich einen sauren anstelle des alkalischen Schaumreinigers. Zusätzlich erfolgte täglich die Desinfektion der Flächen und Maschinen mit einem schwach alkalischen Desinfektionsmittel mit Aktivchlor. Desweiteren befand sich an dem Zerlegeband von Betrieb C eine UV-Lampe, die während des gesamten Zerlegebetriebes aktiviert wurde.

Das tägliche Hygienemanagement von Betrieb C wird als sehr gut beurteilt. Eine Ausnahme stellt das vorhandene Zerlegeband dar, welches nur schwer zu reinigen und daher für den Kontakt mit Rohware ungeeignet war. Davon abgesehen war der subjektive Eindruck der Betriebshygiene in Betrieb C während der ersten

Probenahme sehr gut, jedoch war Betrieb C auf Initiative des betriebsinternen Qualitätsmanagements bereits vor der ersten Beprobung vollständig mittels Aktivchlor desinfiziert worden.

Bei der Auswahl der Probenahmestellen für die Betriebsbeprobungen wurde darauf geachtet, solche Stellen zu wählen, die intensiven Kontakt mit dem Fleisch hatten, wie etwa Zerlegebereich oder Arbeitsgeräte. Ziel war es, die Verteilung der Keime im Betrieb zu erfassen und mögliche Kontaminationsstellen zu identifizieren. Die Probenahmestellen variierten bei den drei untersuchten Betrieben auf Grund verschiedener betrieblicher Strukturen. Nachdem in den jeweiligen Firmen spezielle Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen erfolgten, wurden sie erneut beprobt um den Erfolg der Maßnahmen zu kontrollieren.

Maßnahmen in Betrieb A

Bei der ersten Beprobung von Betrieb A ergaben 15 von 20 Proben ein positives Ergebnis mit dem Primerpaar 16SEF/16SER. Dies sprach für eine hohe Kontamination des Betriebes mit psychrophilen Clostridien. Dieses Ergebnis korrelierte mit der schlechten Betriebshygiene und den insuffizienten Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen des Betriebes.

Nach der ersten Beprobung wurde der Betrieb alle zwei Wochen mit dem peressigsäurehaltigem Desinfektionsmittel Antisept 33 (Ernst GmbH) desinfiziert. Dessen Gehalt an Peressigsäure betrug 15 %. Für die Lebensmittelindustrie zugelassene Desinfektionsmittel auf Peressigsäurebasis haben sich in vorangegangenen Studien als Mittel der Wahl für den Einsatz gegen *C. estertheticum* erwiesen (Böhm, 2013; Boerema et al., 2007; Broda, 2007). Derartige Desinfektionsmittel besitzen ein breites Wirkspektrum und sind sporozid. Zudem sind sie biologisch leicht abbaubar und deshalb einfach zu entsorgen. Peressigsäure zerfällt im Abwasser zu Sauerstoff, Essigsäure und Wasser. Als nachteilig wirkt sich jedoch die Korrosivität der Verbindung aus (Schliesser, 1981; Bessems, 2003). In den Desinfektionsmittelversuchen gegen Sporen von *C. estertheticum* von Böhm (2013) führte die Anwendung von Antisept 33 zu zehn negativen Ergebnissen von insgesamt zwölf beimpften Kunststoffoberflächen.

Fünf Monate nach der ersten erfolgte die zweite Beprobung. Dabei führten noch 5 von 20 Proben zu einem positiven Ergebnis mit dem Primerpaar 16SEF/16SER. Nach weiteren drei Monaten erfolgte die dritte Beprobung von Betrieb A. Sie diente zur Kontrolle, ob der Hygienestatus durch die veränderten Desinfektionsmaßnahmen aufrechterhalten werden konnte. Diesmal waren noch drei von 20 Proben positiv mit dem Primerpaar 16SEF/16SER.

Die stark verminderte Zahl an positiven Tupferproben deutet darauf hin, dass durch den Einsatz von Antisept 33 die Keimbelastung in Betrieb A deutlich reduziert wurde. Ein weiterer Grund könnte die seit der ersten Beprobung gesteigerte Betriebshygiene sein, denn laut Prechter et al. (2002) sind der Einsatz geeigneter Präparate neben einer allgemeinen Betriebshygiene Voraussetzung für eine zufriedenstellende Keimreduktion.

Nach Auswertung der Ergebnisse aus der dritten Beprobung von Betrieb A wurde eine Grundsanierung durchgeführt. Es war davon auszugehen, dass es in dem Betrieb zu einer fortwährenden Keimverschleppung zwischen den verschiedenen Räumlichkeiten kam, denn die Desinfektion mit Antisept 33 erfolgte ausschließlich im Zerlege- und Verarbeitungsraum.

Die Grundsanierung von Betrieb A erfolgte wie unter Kapitel 3.2.3.3.2 beschrieben. Bei dem angewendeten Desinfektionsmittel Wofasteril[®] E 400 (Kesla Pharma Wolfen GmbH) handelte es sich um ein für den Lebensmittelbereich zugelassenes Desinfektionsmittel mit einem Gehalt an Peressigsäure von 35-40 %. In den Studien von Ernst (2003) wurde die Wirksamkeit von Wofasteril[®] E 400 auf Sporen von *B. cereus* untersucht. Bei diesen Untersuchungen wurde Wofasteril[®] E 400 in Kombination mit Alcapur[®] (Kesla Pharma Wolfen GmbH) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Additiv, das für eine bessere Materialverträglichkeit und für eine Reduktion der Geruchsbelastung bei Verwendung von Wofasteril[®] E 400 führt. Ernst (2003) kam zu dem Ergebnis, dass Wofasteril[®] E 400/Alcapur[®] sowohl in Suspensionstests zur sporoziden Wirksamkeitsprüfung als auch im Feldversuch zu einer guten sporoziden Wirkung führt. Der Einsatz von Wofasteril[®] E 400/Alcapur[®] wird gezielt bei mit Sporen belasteten Einrichtungen im Sinne einer Sanierung oder dauerhaft bei Einrichtungen mit ausbleibendem langfristigem Sanierungserfolg empfohlen. Auch in den Untersuchungen von Böhm (2013), die die Wirksamkeit

verschiedener Desinfektionsmittel gegen Sporen von *C. estertheticum* auf Kunststoffoberflächen überprüfte, gehörte Wofasteril® E 400 zu den besten Produkten.

Im Anschluss an die Komplettreinigung erfolgte die vierte Probenahme im Juni 2010 als Erfolgskontrolle. Es wurden 18 Proben von insgesamt neun Stellen genommen. Die reduzierte Tupferprobenzahl resultierte aus dem Umstand, dass nach der Grundsanierung in Betrieb A keine Ware mehr vorhanden war. Bei den ersten drei Beprobungen von Betrieb A wurden jeweils vier Tupferproben aus der Fassreifung genommen (Probenahmeorte 9 und 10). Bei der vierten Beprobung konnte nur ein leeres für die Fassreifung vorgesehenes Kunststofffass beprobt werden. Alle Tupferproben ergaben ein negatives Ergebnis.

Der Ablauf der Grundsanierung, bei der die Räumlichkeiten von Betrieb A an zwei verschiedenen Tagen im Abstand von einer Woche gereinigt und desinfiziert wurden war nicht ideal, jedoch von Seiten des Firmeninhabers gewollt, um die finanziellen Verluste so gering wie möglich zu halten. Die Komplettreinigung der gesamten Anlage an nur einem Tag hätte das Risiko einer Keimverschleppung zwischen „reinen“ und „kontaminierten“ Betriebsbereichen verhindert. Durch die Auslagerung der vor der Sanierung hergestellten Lebensmittel in externe Fleischkühlanhänger sowie die strategisch sinnvolle Trennung der Sanierung in zunächst Kühlräume, Schlacht- und Zerlegeraum sowie anschließend Verkaufsraum, Küche und eines kleineren Kühlraumes für Wurstwaren wurde das Risiko einer Keimverschleppung zumindest minimiert.

Auswertung der Ergebnisse von Betrieb A

Es fällt auf, dass bei der ersten Beprobung in allen drei untersuchten Bereichen, dem Kühlraum, dem Zerlegeraum und der Fassreifung positive Befunde erhoben wurden. Bei der zweiten Beprobung waren ebenfalls in allen drei Bereichen positive Proben nachweisbar, jedoch in deutlich geringerer Zahl. Bei der dritten Beprobung wurden lediglich im Bereich der Fassreifung positive Proben gefunden.

Die Fassreifung ist eine Lagerungsmethode, bei der das Fleisch in einem Kunststoffbehälter aufbewahrt wird und durch einen schweren Deckel luftdicht abgeschlossen in seinem eigenen Saft lagert. Wurde in Betrieb A ein bestimmtes Teilstück benötigt, wurde das jeweilige Fass mit der Hand oder einem Fleischhaken

danach durchsucht. Dabei erfolgte zudem ein Wechsel zwischen verschiedenen Fässern, so dass ein hohes Potenzial der Keimübertragung vorlag.

In Betrieb A wurden in drei von sechs Tupferproben von Tropfsaft von Schweinefleisch *C. estertheticum* (n=2) bzw. *C. estertheticum*-like Organismen (n=1) nachgewiesen. Bereits in den Untersuchungen von Böhm (2013) gelang der Nachweis von *C. estertheticum* aus unverdächtigen Schweinefleischproben aus dem deutschen und italienischen Handel. Da sämtliche beprobten, für die Zerlegung von Fleisch notwendigen Arbeitsgeräte sowie der Zerlegetisch in Betrieb A mit Sporen von *C. estertheticum* verunreinigt waren, liegt eine Kontamination des Schweinefleisches beim Zerlegevorgang nahe. Ebenso denkbar ist es, dass die positiven Befunde durch die Lagerung des ursprünglich *C. estertheticum*-freien Fleisches in mit *C. estertheticum*-Sporen kontaminierten Kunststofffässern kommen.

Die Bandsäge wurde bei der ersten Beprobung negativ getestet, bei der zweiten Probenahme ergab sie dagegen zwei positive Ergebnisse. Dies spricht dafür, dass im Betrieb vorhandene Sporen bei den täglichen Arbeitsabläufen ständig neu verteilt wurden.

Maßnahmen in Betrieb B

Bei der ersten Beprobung von Betrieb B ergaben sechs von 20 Proben ein positives Ergebnis mit dem Primerpaar 16SEF/16SER. Ein Grund für diese im Vergleich zu Betrieb A niedrige Zahl an positiven Proben könnte in der besseren Betriebshygiene von Betrieb B liegen.

Acht Monate später erfolgte die zweite Beprobung. In der Zwischenzeit wurde das peressigsäurehaltige Desinfektionsmittel Wofasteril[®] E 400 (Kesla Pharma Wolfen GmbH) in das tägliche Hygienemanagement des Betriebes eingebunden.

Bei der zweiten Beprobung ergaben alle 20 Tupferproben ein negatives Ergebnis.

Es sind verschiedene Ursachen denkbar, weshalb es in Betrieb B schneller zu negativen Testergebnissen kam als in Betrieb A. Zum einen verwendete Betrieb B Wofasteril[®] E 400 häufiger, denn Betrieb A setzte Antisept 33 nur alle zwei Wochen zur Desinfektion ein. Zum anderen war die Ausgangskontamination von Betrieb B mit *C. estertheticum* wesentlich geringer und der Betrieb hatte eine deutlich bessere allgemeine Betriebshygiene.

Auswertung der Ergebnisse von Betrieb B

Die in Betrieb B positiv auf *C. estertheticum*/*C. estertheticum*-like Organismen getestete Stellen befanden sich vor allem an Stellen im Betrieb, an denen ein Konzentrationsprozess der Sporen denkbar wäre, da sich bei der täglichen Reinigung das Abwasser an diesen Stellen sammelt: Gully, Gullyrinne sowie das Wischblatt eines Bodenwischers im Zerlegeraum.

Die Lüftung im Zerlegeraum von Betrieb B ergab einen weiteren positiven Befund. Auch Broda et al. (2009) wiesen in ihren Untersuchungen *C. estertheticum* im Lüftungssystem von Schlachthöfen nach. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass sich Sporen psychrophiler Clostridien über die Luft im Betrieb verteilen können.

Maßnahmen in Betrieb C

Bei der ersten Beprobung von Betrieb C ergaben 15 von 20 Proben ein positives Ergebnis mit dem Primerpaar 16SEF/16SER. Dies sprach für eine hohe Kontamination des Betriebes mit psychrophilen Clostridien. Dieses Ergebnis korrelierte nicht mit der eigentlich sehr guten Betriebshygiene des Betriebes. Zudem erfolgte bereits sechs Wochen vor der ersten Probenahme eine Komplettreinigung von Betrieb C mit Aktivchlor. Die ursprüngliche Kontamination des Betriebes könnte demzufolge noch größer gewesen sein. Jedoch ist die sporozide Wirksamkeit von Aktivchlor temperaturabhängig und erfordert eine relativ hohe Anwendungskonzentration. Zudem reagiert Aktivchlor bei hohen Konzentrationen sehr empfindlich auf Proteine (Bessems, 2003).

Ein Grund für die hohe Belastung von Betrieb C mit psychrophilen Clostridien könnte das betriebseigene Zerlegeband sein, das auf Grund seiner Konstruktion völlig ungeeignet für den Umgang mit Rohware war. Um eine ordnungsgemäße Reinigung und Desinfektion des Zerlegebandes zu gewährleisten, hätte es nach jeder beendeten Schicht in seine Einzelteile zerlegt werden müssen. Die erste vollständige Zerlegung des Bandes erfolgte jedoch erst, nachdem es bereits ein halbes Jahr in Betrieb war. Da sämtliche Rohware über das Zerlegeband des Betriebes lief, lag darin ein enormes Potenzial der Keimverteilung.

Nach der Umsetzung der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen (Kapitel 3.2.3.5.2) sowie der teilweisen Vernebelung des Betriebes mit einem kationischen Polymer aus der Gruppe der Guanidine (Akafog[®], Aka-Technology GmbH) erfolgte

die zweite Beprobung nach zwei Monaten. Dabei konnten allerdings nur zwölf Tupferproben genommen werden, das Qualitätsmanagement der Firma ließ nicht mehr Probenahmestellen zu. Somit wurde das Zerlegeband nicht analog zu der ersten Beprobung untersucht.

Von den zwölf Proben ergaben acht ein positives Ergebnis mit dem Primerpaar 16SEF/16SER. Eine fundierte Beurteilung der Wirksamkeit der neuen Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen von Betrieb C ist nicht möglich, da dafür notwendige Untersuchungen nicht durchgeführt werden durften. Da jedoch zwei Drittel der Tupferproben aus der zweiten Beprobung zu einem positiven Ergebnis führten, waren die durch das betriebsinterne Qualitätsmanagement durchgeführten Maßnahmen offenbar nicht erfolgreich. Quaternäre Ammoniumverbindungen besitzen laut Bessems (2003) nur eine sehr schwache sporozide Wirkung. Das im Kaltnebelverfahren angewendete Desinfektionsmittel Akafog[®] ist laut Herstellerangaben zur Behandlung aller Arten von Schimmelsporen auf sämtlichen Oberflächen und in der Raumluft geeignet. Es neutralisiert die Zellmembran der Mikroorganismen, wodurch diese durchlässig wird und lebensnotwendige Zellbestandteile austreten.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der zweiten Betriebsbeprobung stehen die Aussagen des Qualitätsmanagements von Betrieb C. Seit der Kaltvernebelung mit Akafog[®] gab es demnach keine aufgegastr Verpackungen mehr, lediglich „Verdachtsfälle“. Diese wurden in ein Sperrlager verbracht und tiefgefroren.

Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand wäre, dass bei der zweiten Beprobung von Betrieb C lediglich die DNA der psychrophilen Clostridien nachgewiesen wurde, jedoch keine lebensfähigen Organismen mehr vorhanden waren. Laut Josephson et al. (1993) und Rudi et al. (2002) werden bei der Polymerasekettenreaktion auch tote Mikroorganismen erfasst. Es ist jedoch auch denkbar, dass das veränderte Management im Umgang mit der Vakuumware in Betrieb C dazu führte, dass es zu keinen Bombagen mehr kam. Die Ware wurde regelmäßig kontrolliert und bei Verdacht frühzeitig tiefgefroren.

Auswertung der Ergebnisse von Betrieb C

Bei der ersten Probenahme waren zwölf der insgesamt 14 im Bereich des Zerlegebandes genommenen Proben positiv. Dieses war auf Grund seiner

Konstruktion völlig ungeeignet für den Umgang mit Rohware. Da sämtliches Fleisch in Betrieb C über dieses Zerlegeband lief, lag in ihm mit großer Wahrscheinlichkeit die Ursache für die Kontamination der Ware. Ursprünglich *C. estertheticum*-freies Fleisch wurde durch den Transport auf dem kontaminierten Zerlegeband regelrecht mit Sporen von *C. estertheticum* beimpft.

Bei der zweiten Beprobung von Betrieb C waren von den sechs am Zerlegeband genommenen Tupferproben drei positiv. Fünf von sechs im Kühlagerraum genommenen Proben waren positiv, wohingegen bei der ersten Probenahme von Betrieb C nur zwei von insgesamt sechs Proben im Kühlagerraum positiv waren. Diese Diskrepanz könnte durch eine mögliche insuffiziente Detektion der *C. estertheticum*-Sporen mittels der angewendeten Methode bei der Probenahme entstanden sein. Denkbar ist auch, dass die im Betrieb vorhandenen Sporen bei der täglichen Arbeit ständig neu verteilt wurden.

Auswertung des Nachweises von *C. bowmanii*, *C. frigoris* und *C. gasigenes*

Die Untersuchung auf *C. bowmanii* und *C. frigoris* erfolgte nur bei den Tupferproben aus Betrieb A, B und C, die zuvor in der PCR zum Nachweis von *C. estertheticum* nach Broda et al. (2003a) mit dem Primerpaar 16SE ein positives Ergebnis ergaben, da in den Vorversuchen der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, dass dieses Primerpaar neben CEE, CEL sowie *C. estertheticum*-like Organismen auch *C. bowmanii* und *C. frigoris* erfasst. Aus diesem Grund konnte die PCR nach Broda et al. (2003a) mit dem Primerpaar 16SE als Screening-PCR eingesetzt werden.

C. bowmanii wurde bei allen Betriebsbeprobungen nur einmal bei der zweiten Probenahme von Betrieb C im Bereich des Gullys im Kühlagerraum nachgewiesen.

C. frigoris trat im Vergleich dazu häufig auf. Der Keim wurde in allen drei Betrieben nachgewiesen. Bei der ersten Probenahme von Betrieb A waren sieben Tupferproben positiv auf *C. frigoris*. Positive Proben wurden im Fleischkühlraum, auf dem Zerlegebrett und sowohl in der Fassreifung von Rindfleisch als auch in der Fasslagerung von Schweinefleisch gefunden. Bei der zweiten und dritten Beprobung von Betrieb A waren noch zwei Proben positiv auf *C. frigoris*, sie wurden in der Fassreifung von Rindfleisch gefunden. In Betrieb B wurde *C. frigoris* bei der ersten Beprobung aus der Gullyrinne im Zerlegebereich nachgewiesen. In Betrieb C wurde

C. frigoris bei der ersten Beprobung an drei Stellen nachgewiesen, alle im Bereich des Zerlegebands.

Böhm (2013) wies in ihren Untersuchungen *C. estertheticum* auf sechs von zwölf Schweinefleischproben aus dem Handel nach. Der Nachweis von *C. frigoris* auf Schweinefleisch ist nach eigenem Kenntnisstand bisher noch nicht beschrieben.

Alle Proben der Betriebe A, B und C wurden in das PCR- System zum Nachweis von *C. gasigenes* eingesetzt.

C. gasigenes wurde lediglich bei der ersten Probenahme in Betrieb C nachgewiesen, dabei waren zwölf von 20 Tupferproben positiv. Der Keim wurde sowohl im Zerlegebereich als auch im Bereich der Kühlung nachgewiesen.

Die Tupferproben aus den Betriebsbeprobungen wurden analog zu Boerema et al. (2003) 21 Tage bei +4 °C inkubiert. *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Organismen wurden in der vorliegenden Arbeit am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von *C. frigoris*. Die Nachweishäufigkeit der einzelnen Keime könnte in direktem Zusammenhang mit deren jeweiligen Wachstumsoptima und der verwendeten Inkubationstemperatur der Tupferproben liegen. Das Wachstumsoptimum von *C. estertheticum* liegt zwischen +6 und +8 °C, das von *C. frigoris* liegt zwischen +5 und +7 °C (Spring et al., 2003). Das Wachstumsoptimum von *C. bowmanii* liegt dagegen zwischen +12 und +16 °C (Spring et al., 2003) und das von *C. gasigenes* zwischen +20 und +22 °C (Broda et al., 2000c), so dass deren geringe Nachweisquote in direktem Zusammenhang mit der angewendeten Methodik stehen könnte.

Der häufige Nachweis von *C. gasigenes* bei der ersten Beprobung von Betrieb C deutet auf eine starke Kontamination des Betriebes mit diesem Keim hin. Laut Broda et al. (2000c) wächst *C. gasigenes* zwischen -1,5 und +26 °C und kann sich daher trotz der Inkubationstemperatur der Proben von +4 °C vermehrt haben. Zudem ist der PCR-Nachweis bei der konventionellen Gelelektrophorese von *C. gasigenes* mit einer Nachweisgrenze von $1,4 \times 10^1$ Organismen/ml für vegetative Keime und von $4,6 \times 10^2$ Organismen/ml für Sporen sehr sensitiv.

Bei der zweiten Beprobung von Betrieb C wurde *C. gasigenes* nicht mehr nachgewiesen, *C. estertheticum* dagegen schon. Eventuell sind *C. gasigenes* und dessen Sporen sensibler gegen die angewendeten Desinfektionsmittel als *C. estertheticum*. Um diese Hypothese zu verifizieren sind weitere Untersuchungen notwendig, in denen die Wirksamkeit verschiedener Desinfektionsmittel auf die Sporen verschiedener psychrotoleranter Clostridien getestet wird. Auch der Vergleich des Aufbaus der Sporen verschiedener psychrotoleranter Clostridien wäre von Interesse, um eventuell vorhandene Unterschiede festzustellen.

Da eine Kultivierung der in dieser Arbeit nachgewiesenen Clostridien nicht durchgeführt wurde, wäre in weiterführenden Untersuchungen zu überprüfen, in wieweit die entsprechenden Clostridien aus PCR-positiven Proben zu isolieren sind.

Schlussfolgerungen

Psychrotolerante Clostridien haben sich inzwischen zu einem ernstem Problem in der Fleischindustrie entwickelt und führen weltweit zu hohen wirtschaftlichen Verlusten.

Es stellt sich die Frage, was die Ursache für das scheinbar so plötzliche auftreten dieser Mikroorganismen Ende der 80er Jahre des 20sten Jahrhunderts ist.

So besteht die Möglichkeit, dass es sich dabei um ubiquitäre Keime handelt, die weltweit vorkommen und sich erst im Zuge der veränderten Umstände in der Fleischindustrie zu einem Problem entwickelten. Durch die Rationalisierung in der Lebensmittelwirtschaft wurden die Herstellungsprozesse an wenigen Orten konzentriert und damit die Distributionswege verlängert, weshalb die Einführung von wirksamen Methoden zur Gewährleistung der Frische notwendig war (Neue Verpackung, 1970). Es kam zu einem Wandel von der traditionellen aeroben Reifung der Rinderhälften und -viertel hin zur Zerlegung in Fleischedelteile und der Teilefleischvermarktung in der Vakuumverpackung (Böhme, 1981; Helmer, 1975; Tändler und Heinz, 1970). Die Vakuumverpackung von frischem, gekühltem Rindfleisch setzte sich Ende der 70er Jahre des 20sten Jahrhunderts durch (Husband, 1982).

Eine weitere Möglichkeit, die das gehäufte Vorkommen von psychrophilen Clostridien in fleischverarbeitenden Betrieben erklären könnte, ist die im Zuge der Globalisierung erfolgte Einschleppung der Keime aus dem Ausland. In den Untersuchungen von Dainty et al. (1989) in Großbritannien konnte ein psychrophiles Bakterium von

importiertem Rindfleisch aus Südafrika nachgewiesen werden. Das isolierte Bakterium wurde später von Collins et al. (1992) als *C. estertheticum* benannt. Die bestätigten Fälle von Blown Pack Spoilage in Nordamerika, Neuseeland, Deutschland, Irland und Großbritannien (Broda et al., 1996a; Byrne et al., 2009; Helps et al., 1999; Kalchayanand et al., 1989; Ziegler, 2009) könnten auf eine durch importiertes Fleisch ausgelöste, weltweite Ausbreitung der Problematik hindeuten. Gegen diese These spricht jedoch die Tatsache dass Broda et al. (2009) und Moschonas et al. (2009) *C. estertheticum* und *C. gasigenes* in Bodenproben der Umgebung von Schlachthöfen in Neuseeland und Irland nachweisen konnten. Bereits Newton et al. (1978) gingen davon aus, dass der Lebensraum von auf Schlachthöfen nachgewiesenen psychrotrophen Bakterien sehr wahrscheinlich der Erdboden ist. Moschonas et al. (2009) gehen davon aus, dass psychrophile Clostridien vom Boden über die Hufe der Schlachttiere auf deren Fell gelangen können. Laut Ray et al. (2008) steigt im Laufe der Zeit die mikrobielle Grundbelastung der Schlachthofumgebung, so dass das Alter der Betriebe ebenfalls ein entscheidender Faktor ist.

Die wahrscheinlichste Quelle für den Eintrag von psychrotoleranten Clostridien in fleischverarbeitende Betriebe scheinen jedoch auf Grund der Ergebnisse bisheriger Studien (Boerema et al., 2003; Broda et al., 2002; Broda et al., 2009; Moschonas et al., 2009; Moschonas et al., 2011b) die Fäzes der Schlachttiere zu sein. Das Fell scheint in dem Zusammenhang ebenfalls eine wichtige Rolle beim Eintrag psychrotoleranter Clostridien in die Betriebe zu spielen, in dem es als Transportmedium für Fäzes fungiert (Moschonas et al., 2011b). So findet die Verunreinigung der Karkassen mit Clostridien, die Blown Pack Spoilage verursachen laut Broda et al. (2009) wahrscheinlich hauptsächlich während der ersten Bearbeitung der Karkassen beim Zurichten statt. Broda et al. (2009) wiesen in ihren Untersuchungen psychrotolerante Clostridien zudem im Belüftungssystem eines Schlachtbetriebes nach, so dass eine potentielle Verunreinigung des gesamten Betriebes über das Belüftungssystem nicht ausgeschlossen ist.

Weiterführende Untersuchungen zur Identifizierung prädisponierender Faktoren für die Kontamination der Schlachttiere mit psychrotoleranten Clostridien sollten erfolgen. Denkbare Forschungsfelder wären die für die späteren Schlachttiere

verwendeten Futtermittel sowie die Stallungen der Rinder, denn Moschonas et al. (2011b) gehen davon aus, dass die Kontamination der Schlachttiere mit psychrotoleranten Clostridien entweder durch Sporen erfolgt, die das Verdauungssystem der Tiere passieren oder die aus der Umwelt der Schlachttiere stammen. Interessant wäre auch die Frage, inwiefern das Ausbringen von Gülle auf landwirtschaftliche Nutzflächen Einfluss auf die Problematik hat und ob es dadurch zu einer Neuverteilung und Konzentration der Sporen psychrophiler Clostridien kommt.

Die Ergebnisse des vorliegenden Projektes stimmen mit den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen überein, dass eine gute Betriebshygiene sowie die Verwendung peressigsäurehaltiger Desinfektionsmittel entscheidenden Einfluss auf das Auftreten von Blown Pack Spoilage hat, indem die Zahl an Clostridiensporen im Betrieb reduziert wird (Böhm, 2013; Boerema et al., 2007; Broda, 2007; Moschonas et al., 2009). Ist ein fleischverarbeitender Betrieb erst einmal mit den Sporen kontaminiert, sind diese sehr schwer wieder zu entfernen, zudem sind die Betriebe selbst nach erfolgter Grundsanierung nicht vor einem Neueintrag der Keime sicher. Gerade deshalb steht eine kontinuierliche und konsequente Betriebs- und Prozesshygiene im Vordergrund, um das Auftreten von Blown Pack Spoilage zu vermeiden.

Um den Eintrag der Mikroorganismen in die Betriebe so gering wie möglich zu halten, ist laut Moschonas et al. (2009) das Waschen der Tiere vor der Schlachtung gut geeignet. Das Fell gilt als die wahrscheinlichste Quelle für die Kontamination des Fleisches mit psychrophilen Clostridien, so dass eine gute Hygiene beim Zuschneiden der Karkassen und damit die Verhinderung des Übertretens der Sporen vom Fell auf die Karkassen wesentlich dazu beiträgt, Blown Pack Spoilage zu vermeiden (Boerema et al., 2003; Broda et al., 2002; Broda et al., 2009; Clemens et al., 2010).

Daneben ist durch die Verordnung (EU) Nr. 101/2013, die am 24. 02. 2013 in Kraft getreten ist, nun auch in Deutschland die Behandlung von Rinderschlachtkörpern mit Milchsäure zur Verringerung der Oberflächenverunreinigung erlaubt. Die Milchsäurelösungen dürfen nur auf ganzen Schlachtkörpern, Schlachtkörperhälften oder –vierteln im Schlachthof verwendet werden und diese Behandlung soll in die gute Hygienepaxis und HACCP-gestützte Systeme integriert werden. Die Europäische Kommission stützte sich bei ihrer Entscheidung auf ein Gutachten der

Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), aus dem hervorging, dass Milchsäure eine mögliche mikrobiologische Verunreinigung des Fleisches signifikant verringern kann, ohne dabei der Gesundheit der Verbraucher, der Umwelt oder dem Fleisch selbst zu schaden (top agrar online, 2013). Auch die Untersuchungen von Jones et al. (2009) ergaben, dass die Beimpfung von Rindfleisch mit dem Milchsäurebakterium *Lactobacillus sakei* vor der Vakuumierung das Auftreten von Blown Pack Spoilage um eine Woche hinauszögern kann. In diesem Zusammenhang sollte das Ziel zukünftiger Forschungen im Kampf gegen Blown Pack Spoilage die Entwicklung von antimikrobiell aktiven Verpackungen sein. Diese können laut Verordnung (EG) Nr. 450/2009 die Haltbarkeit eines Lebensmittels verlängern und dürfen gezielt Bestandteile enthalten, welche Stoffe an das verpackte Lebensmittel abgeben. So entwickelte Hauser (2013) eine antimikrobiell aktive Folie auf Lackbasis mit Sorbinsäure. Bei Anwendung dieser Folie konnte die Gesamtkeimzahl auf mit *E. coli* beimpftem Schweinelachs nach einer Lagerungszeit von sieben Tagen bei +8 °C auf etwa ein Viertel des Anfangswertes reduziert werden (Hauser, 2013). Aus diesem Grund wäre die Entwicklung einer mit Milchsäure behandelten Folie zur Anwendung bei vakuumverpacktem Rindfleisch von großer Bedeutung. Dadurch könnte den Herstellern von Rindfleisch unter Umständen die nötige Zeit verschafft werden, um die Ware vor dem Auftreten von Blown Pack Spoilage zu verkaufen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren hat ein durch psychrophile und psychrotolerante *Clostridium* spp. ausgelöstes Verderbsgeschehen bei vakuumverpacktem Rindfleisch, bei dem es zum Aufgasen der Vakuumverpackungen kommt, immer mehr an Bedeutung gewonnen. Neben *C. estertheticum* und *C. gasigenes* wurden eine Reihe verschiedener psychrophiler Clostridien beschrieben, die die Fähigkeit für dieses Verderbsgeschehen besitzen.

Da divergente Beschreibungen dieser verderbsverursachenden Bakterien vorliegen, wurden sechs psychrotolerante Clostridien-Referenzstämme phänotypisch untersucht und die Ergebnisse mit bereits bestehenden Studien verglichen. Dabei wurden insbesondere hinsichtlich des Hämolyseverhaltens auf Blutagarplatten sowie der Größe der vegetativen Zellen abweichende Ergebnisse ermittelt. Bei der Untersuchung von *C. gasigenes* wurden obendrein im letzten Drittel der Stäbchen deutliche Querfortsätze beobachtet, die nach derzeitigem Kenntnisstand bisher in der Literatur nicht beschrieben wurden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mehr Erkenntnisse über das Vorkommen und die Verbreitung von psychrotoleranten Clostridien in fleischverarbeitenden Betrieben zu erlangen. Im Vorfeld dazu wurde die Nachweisbarkeit von *C. estertheticum*-Sporen von unterschiedlichen, häufig in fleischverarbeitenden Betrieben vorkommenden Oberflächen mittels Wattetupfern überprüft. Dabei konnten Sporen auf Kunststoff- und Edelstahloberflächen nachgewiesen werden, wobei die Nachweisintensität bei glatten Kunststoff- und Edelstahloberflächen annähernd gleich ausfiel, während die Nachweisintensität bei eingekerbten Kunststoffoberflächen deutlich abnahm.

Da bislang kein PCR-System zum Nachweis von *C. bowmanii* und *C. frigoris* vorhanden war, wurde zur Beantwortung der Fragestellung ein neues PCR-System entwickelt sowie das von Broda et al. (2003a) entwickelte System zum Nachweis von *C. gasigenes* modifiziert. Bei Anwendung der konventionellen Gelelektrophorese lag die Nachweisgrenze von vegetativen Zellen im Bereich von 10^1 bis 10^3 Organismen/ml Fleischtropfsaft. Bei Anwendung des Experion Automated Electrophoresis System mit vorangehender Aufreinigung der PCR-Produkte lag die Nachweisgrenze zwischen 10^3 und 10^4 Organismen/ml Fleischtropfsaft. Die

Nachweisgrenze für Sporen von *C. frigidus* und *C. gasigenes* war sowohl bei Anwendung der konventionellen Gelelektrophorese als auch bei Anwendung des Experion Automated Electrophoresis Systems für den jeweiligen Keim identisch. Sie lag bei *C. frigidus* bei 10^5 Organismen/ml Fleischtropfsaft, bei *C. gasigenes* bei 10^2 Organismen/ml Fleischtropfsaft. Die Nachweisgrenze für Sporen von *C. bowmanii* konnte aus technischen Gründen nicht ermittelt werden.

Beim Vergleich des konventionellen sowie des automatisierten Elektrophorese-Systems zeigte sich, dass es bei einer Aufreinigung der PCR-Produkte zu DNA-Verlusten kommen kann, die sich in der Ermittlung der Nachweisgrenze widerspiegeln. Wird auf eine Aufreinigung verzichtet, führen beide Elektrophorese-Methoden zu gleich guten Ergebnissen.

Abschließend wurden drei fleischverarbeitende Betriebe auf das Vorkommen von *C. estertheticum*, *C. gasigenes*, *C. frigidus* und *C. bowmanii* unter Anwendung der entwickelten Methoden untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass in jedem Betrieb *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Organismen vorhanden waren. *C. frigidus* wurde ebenfalls in allen Betrieben detektiert, jedoch mit deutlich geringerer Häufigkeit, wohingegen *C. bowmanii* nur in einer Probe in Betrieb C nachweisbar war. *C. gasigenes* wurde ebenfalls nur in Betrieb C an zwölf verschiedenen Beprobungsstellen nachgewiesen.

In den drei Betrieben wurden unterschiedliche Maßnahmen zur Eliminierung der psychrotoleranten Clostridien ergriffen und der Erfolg der Maßnahmen durch erneute Untersuchungen kontrolliert. Dabei wurde deutlich, dass durch die Verbesserung der allgemeinen Betriebshygiene und durch die Anwendung von peressigsäurehaltigen Desinfektionsmitteln die Nachweisbarkeit von psychrotoleranten Clostridien erheblich gesenkt werden konnte. Durch die Grundsanierung eines ursprünglich stark kontaminierten Betriebes wurde erreicht, dass keine der im Anschluss daran genommenen Tupferproben zu einem positiven Ergebnis auf psychrotolerante Clostridien führte.

7 SUMMARY

In the last few years the spoilage of vacuum-packed, refrigerated beef due to psychrophilic and psychrotolerant clostridia, including production of gas inside the pack, has gained in importance. In addition to *C. estertheticum* and *C. gasigenes*, further psychrophilic clostridia have been described, which are able to cause Blown Pack Spoilage.

Because there are divergent descriptions of these spoilage-causing bacteria, the phenotypic characteristics of the reference strains of six psychrotolerant clostridia were examined and the results were compared. In doing so, dissent results have been detected especially concerning hemolysis on blood agar plates as well as size of the vegetative cells. The examination of *C. gasigenes* showed that there are distinct transverse processes in the last third of the rods of *C. gasigenes*, which, at present state of knowledge, have not been mentioned in the literature yet.

The intention of this study was, to get more findings about the occurrence and the dissemination of psychrotolerant clostridia in meat abattoirs. Previously, the traceability of spores of *C. estertheticum* from different surfaces, which often occur in meat abattoirs, with cotton wool wads, has been checked. In doing so, spores could be detected from surfaces of plastic and stainless steel, whereat the intensity of detection was almost the same with smooth plastic surfaces and stainless steel surfaces. With notched plastic surfaces, the intensity of the PCR products clearly declined.

Since until now no PCR method for the detection of *C. frigoris* and *C. bowmanii* existed, a new PCR method was developed in order to be able to answer the question. Furthermore, the method by Broda et al. (2003a) for the detection of *C. gasigenes* was modified. In using conventional gelelectrophoresis, the detection limit for vegetative cells was between 10^1 and 10^3 organisms/ml meat drip. When using Experion Automated Electrophoresis System with preceding clean-up of the PCR products, the detection limit for vegetative cells was between 10^3 and 10^4 organisms/ml meat drip. The detection limit of spores of *C. frigoris* und *C. gasigenes* was identically by using conventional gelelectrophoresis and Experion Automated Electrophoresis System, respectively. With *C. frigoris*, the PCR-method was capable

of detecting 10^5 spores/ml meat drip and with *C. gasigenes* 10^2 spores/ml meat drip. Because of technical reasons, it was not possible to determine the limit of detection of spores of *C. bowmanii*.

By comparing the conventional and the automated electrophoresis system it arose, that there can be a loss of DNA when PCR products are cleaned up. This is reflected in the detection limit. When disclaiming the clean-up of PCR products, both methods lead to similar good results.

In the end, three meat abattoirs were examined on the occurrence of *C. estertheticum*, *C. gasigenes*, *C. frigoris* and *C. bowmanii* by using the developed methods. The results have shown, that *C. estertheticum* and *C. estertheticum*-like organisms were present in each of these plants. *C. frigoris* was detected, too, in all of the meat plants, but with much less frequency, whereas *C. bowmanii* was only detected in one sample of company C. *C. gasigenes* was only detected in company C as well, at twelve different sampling places.

Different actions have been taken place in the three meat plants to eliminate psychrotolerant clostridia. Another check of these abattoirs should indicate, if these measures were successful. It became apparent, that by increasing the general hygiene policy and by using disinfectants with peracetic acid, the detection frequency of psychrotolerant clostrida could be declined considerably. With the extensive reconstruction of an originally heavy contaminated plant, it was achieved, that none of the swab samples, which were taken following to it, were tested positive for psychrotolerant clostridia.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abu Al-Soud, W. und Radstrom, P. (2000). Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *Journal of Clinical Microbiology* **38(12)**, 4463-4470.
- Adam, K. H., Flint, S. H. und Brightwell, G. (2010). Psychrophilic and psychrotrophic clostridia: sporulation and germination processes and their role in the spoilage of chilled, vacuum-packaged beef, lamb and venison. *International Journal of Food Science and Technology* **45(8)**, 1539-1544.
- Antic, D., Blagojevic, B., Ducic, M., Nastasijevic, I., Mitrovic, R. und Buncic, S. (2010). Distribution of microflora on cattle hides and its transmission to meat via direct contact. *Food Control* **21(7)**, 1025-1029.
- Bagadi, H. O. und Sewell, M. M. H. (1974). A study of the route of dissemination of orally administered spores of *Clostridium novyi* type B in guinea-pigs and sheep. *Research in Veterinary Science* **17(2)**, 179-181.
- Baylis, C. L. (2006). *Enterobacteriaceae*. In Food Spoilage Organisms, Blackburn, C. W., 1. Auflage, Woodhead Publishing in Food Science, 624-667.
- Bell, R. G. (1997). Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. *Journal of Applied Microbiology* **82(3)**, 292-300.
- Bessems, E. (2003). Desinfektionsmittel für die Lebensmittel- und Veterinärhygiene, 1. Auflage, Behr's Verlag, 1-150.
- Beutling, D. (1992a). Fleisch. In Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene, Fehlhaber, K., Janetschke, P., 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, 191-241.
- Beutling, D. (1992b). Hygieneregime im Lebensmittelverkehr. In Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene, Fehlhaber, K., Janetschke, P., 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, 173-187.
- Bhadsavle, C. H., Shehata, T. E. und Collins, E. B. (1972). Isolation and identification of psychrophilic species of *Clostridium* from milk. *Applied and Environmental Microbiology* **24(5)**, 699-702.
- Biorad Bulletin 10006453
URL: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10006453A.PDF>
(Zugriffdatum: März 2012)
- Block, S. (2001). Definition of Terms. In Disinfection, Sterilization and Preservation, Block, S., 5. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins Verlag, 19-28.

- Böhm, V. (2013): Untersuchungen zur Prävalenz und zur Prävention von *Clostridium estertheticum* in Rind-, Wild-, Lamm-, Schweine- und Putenfleisch, Veterinärmedizinische Dissertation, Tierärztliche Fakultät, LMU München.
- Böhme, C. F. (1981): Die Reifung und Lagerung von Fleisch in Verbundfolienbeuteln. *Fleischerei* **32(10)**, 786-788.
- Boerema, J. A., Broda, D. M. und Bell, R. G. (2002). PCR detection of psychrotolerant clostridia associated with deep tissue spoilage of vacuum-packed chilled meats. *Letters in Applied Microbiology* **35(5)**, 446-450.
- Boerema, J. A., Broda, D. M. und Bell, R. G. (2003). Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing blown pack spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-based and molecular detection procedures. *Letters in Applied Microbiology* **36(6)**, 406-411.
- Boerema, J., Broda, D., Penney, N. und Brightwell, G. (2007). Influence of peroxyacetic acid-based carcass rinse on the onset of "blown pack" spoilage in artificially inoculated vacuum-packed chilled beef. *Journal of Food Protection* **70(6)**, 1434-1439.
- Bolton, D. J., Doherty, A. M. und Sheridan, J.J. (2001). Beef HACCP: intervention and non-intervention systems. *International Journal of Food Microbiology* **66(1-2)**, 119-129.
- Borch, E., Kant-Muermans, M. L. und Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* **33(1)**, 103-120.
- Bowman, J. P., Rea, S. M., Brown, M. V., McCammon, S. A., Smith, M. C. und McMeekin, T. S. (2000). Community structure and psychrophily in Antarctic microbial ecosystems. In *Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, Bell, M., Brylinsky, M. und Johnson-Green, M., 1. Auflage, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, 287-292.
- Brade, W (2007). Rinderhaltung und Fleischerzeugung. In *Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft 313*, Brade, W. und Flachowsky, G., 1-4.
- Brambilla, E., Hippe, H., Hagelstein, A., Tindall, B. J. und Stackebrandt, E. (2001). 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Extremophiles* **5(1)**, 23-33.
- Brecheisen, G. (2014): Auswirkung der Schlachtung unterschiedlich stark verschmutzter Rinder auf die mikrobiologische Belastung ihrer Schlachtkörper, Veterinärmedizinische Dissertation, Tierärztliche Fakultät, LMU München.

- Brightwell, G., Clemens, R., Ulrich, S. und Boerema, J. (2007). Possible involvement of psychrotolerant *Enterobacteriaceae* in blown pack spoilage of vacuum-packaged raw meats. *International Journal of Food Microbiology* **119(3)**, 334-339.
- Brightwell, G. und Clemens, R. (2012). Development and validation of a real-time PCR assay specific for *Clostridium estertheticum* and *C. estertheticum*-like psychrotolerant bacteria. *Meat science* **92(4)**, 697-703.
- Brocklehurst, T. F. und Lund, B. M. (1982). Isolation and properties of psychrotrophic and psychrophilic, pectolytic strains of *Clostridium*. *Journal of Applied Bacteriology* **53(33)**, 351-361.
- Broda, D. M., De Lacy, K. M., Bell, R. G., Braggins, T. J. und Cook, R. L. (1996a). Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *International Journal of Food Microbiology* **29(2-3)**, 335-352.
- Broda, D. M., De Lacy, K. M., Bell, R. G. und Penney, N. (1996b). Association of psychrotrophic *Clostridium* spp. with deep tissue spoilage of chilled vacuum-packed lamb. *International Journal of Food Microbiology* **29(2-3)**, 371-378.
- Broda, D. M., De Lacy, K. und Bell, R. (1998). Influence of culture media on the recovery of psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with the spoilage of vacuum-packed chilled meats. *International Journal of Food Microbiology* **39(1-2)**, 69-78.
- Broda, D. M., Lawson, P. A., Bell, R. G. und Musgrave, D. R. (1999). *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 1539-1550.
- Broda, D. M., Musgrave, D. R. und Bell, R. G. (2000a). Use of restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate strains of psychrophilic and psychrotropic clostridia associated with blown pack' spoilage of vacuum-packed meats. *Journal of Applied Microbiology* **88(1)**, 107-116.
- Broda, D. M., Saul, D. J., Bell, R. G. und Musgrave, D. R. (2000b). *Clostridium algidixylanolyticum* sp. nov., a psychrotolerant, xylan-degrading, spore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50(2)**, 623-631.
- Broda, D. M., Saul, D. J., Lawson, P. A., Bell, R. G. und Musgrave, D. R. (2000c). *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50(1)**, 107-118.

- Broda, D. M., Bell, R. G., Boerema, J. A. und Musgrave, D. R. (2002). The abattoir source of culturable psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled venison. *Journal of Applied Microbiology* **93(5)**, 817-824.
- Broda, D. M., Boerema, J. A. und Bell, R. G. (2003a). PCR detection of psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled meats. *Journal of Applied Microbiology* **94(3)**, 515-522.
- Broda, D. M., Musgrave, D. R. und Bell, R. G. (2003b). Molecular differentiation of clostridia associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats using internal transcribed spacer polymorphism analysis. *International Journal of Food Microbiology* **84(1)**, 71-77.
- Broda, D. M. (2007). The effect of peroxyacetic acid-based sanitizer, heat and ultrasonic waves on the survival of *Clostridium estertheticum* spores in vitro. *Letters in Applied Microbiology* **45(3)**, 336-341.
- Broda, D. M., Boerema, J. A. und Brightwell, G. (2009). Sources of psychrophilic and psychrotolerant clostridia causing spoilage of vacuum-packed chilled meats, as determined by PCR amplification procedure. *Journal of Applied Microbiology* **107(1)**, 178-186.
- Brömmer, J. (2005): Produktionssysteme, räumliche Verteilung und Struktur der Rindermast in Deutschland – eine expertengestützte Analyse, Diplomarbeit im Fach Agrarpolitik/Betriebswirtschaft, Fakultät für Agrarwissenschaften und Landschaftsarchitektur, Fachhochschule Osnabrück.
- Brown, K. L. (2000). Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin* **56(1)**, 158-171.
- Brunner, B., Bülte, M. und Heitmann, H. (2000). „Desinfektionsmittelresistenz“ bei Bakterien aus dem Lebensmittelbereich. In Proceed, 41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Garmisch-Partenkirchen 25.09.01-28.09.2000, Eigenverlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 330–335.
- Burchardi, H., Hansen, A., Herzfeld, T., Thiele, S. und Thiele, H. D. (2007). Die Märkte für Fleisch und Fleischprodukte. *Agrarwirtschaft* **56(1)**, 48-70.
- BVDF (Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie e.V.) (2012): Fleischverzehr je Kopf der Bevölkerung. In: Geschäftsbericht 2011/2012 des BVDF, S. 14, Tab. 5.
- BVDF (Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie e.V.) (2014): Fleischverzehr je Kopf der Bevölkerung. In: Geschäftsbericht 2013/2014 des BVDF, S. 10, Tab. 5.

- Byrne, B., Monaghan, A., Lyng, J., Sheridan, J. und Bolton, D. J. (2009). A case of 'blown pack' meat linked to *Clostridium estertheticum* in Ireland. *Journal of Food Safety* **29(4)**, 629-635.
- Callow, E. H. und Ingram, M. (1955). Bone taint in beef. *Food* **24**, 52-55.
- Cato, E. P., George, W. L. und Finegold S. M. (1986). Genus *Clostridium prazmowski*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 2., Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. und Holt, J. G., Williams & Wilkins Co, 1141-1200.
- Cavill, L., Renteria-Monterrubio, A. L., Helps, C. R. und Corry, J. E. L. (2011). Detection of cold-tolerant clostridia other than *Clostridium estertheticum* in raw vacuum-packed chill-stored meat. *Food Microbiology* **28(5)**, 957-963.
- Chang, B, Larson, E. und Whitman-Guliaev, C. (2010). The Experion System: Microfluidics-based automated electrophoresis. *Bulletin* 5285, Bio-Rad Laboratories Inc.
- Chaves, R. D., Silva, A. R., Sant'Ana, A. S., Campana, F. B. und Massaguer, P. R. (2012). Gas-producing and spoilage potential of *Enterobacteriaceae* and lactic acid bacteria isolated from chilled vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Science and Technology* **47(8)**, 1750-1756.
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J. und Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* **20(7)**, 1717-1723.
- Clemens, R. M., Adam, K. H. und Brightwell, G. (2010). Contamination levels of *Clostridium estertheticum* spores that result in gaseous spoilage of vacuum-packaged chilled beef and lamb meat. *Letters in Applied Microbiology* **50(6)**, 591-596.
- Collins, M. D., Rodrigues, U. M., Dainty, R. H., Edwards, R. A. und Roberts, T. A. (1992). Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: description of *Clostridium estertheticum* sp. nov. *FEMS Microbiology Letters* **96(2-3)**, 235-240.
- Dainty, R. H., Edwards, R. A. und Hibbard, C. M. (1989). Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **49(4)**, 473-486.
- DBV (Deutscher Bauern Verband) (2014). Tierische Erzeugung. In Situationsbericht 2013/2014 des DBV, 218-298.

- Deblitz, C. und Brüggemann, D. (2007). Rinderfleischerzeugung aus globaler Sicht – Rahmenbedingungen, Produktion, Handel, Perspektiven. *In* Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft 313, Brade, W. und Flachowsky, G., 265-285.
- De Hoog, G. S., Guarro, J., Tan, C. S., Winternans R. G. F. und Gené, J. (1995). Pathogenic fungi and common opportunists. *In* Atlas of Clinical Fungi, Ausgabe 4, Neuauflage, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira, 1-242.
- De Lacy, K., Broda, D. und Bell, R. (1998). In vitro assessment of psychrotrophic *Clostridium* spp. as possible causative agents of bone-taint in beef. *Food Microbiology* **15**(6), 583-589.
- De Loos, G. (1995). Disinfectants: their selection and effective application. *In* New Challenges in meat hygiene: specific problems in cleaning and disinfection, Burt, S. und Bauer, F., 1. Auflage, ECCEAMST Foundation, 61-64.
- De Lorenzo (2011): Genes that move the window of viability of life: Lessons from bacteria thriving at the cold extreme. *Bioessays* **33**(1), 38-42.
- Deutscher Fleischer - Verband (2012/2013): Fleischverzehr, Geschäftsbericht 2012/2013, Seite 38-41. URL:<http://www.fleischerhandwerk.de/medien--und-presseservice/daten-und-fakten/geschaeftsbericht/auszge-aus-dem-geschaeftsbericht.html> (Zugriffsdatum: März 2014).
- Eeckhaut, V., Boyen, F., Pasmans, F., Uzal, F. A., Ducatelle, R., Van Hoorebeke, S., Maris, J., Haesebrouk, F. und Van Immerseel, F. (2012). *Clostridium novyi* type B as a causative agent of bovine meat spoilage. *Anaerobe* **18**(3), 286-288.
- Ernst, C. (2003): Optimierung von Desinfektionsverfahren in Verpflegungs- und Betreuungseinrichtungen der Bundeswehr im Hinblick auf die *Bacillus cereus*-Belastung von Oberflächen und Lebensmitteln, Veterinärmedizinische Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Freie Universität Berlin.
- Fehlhaber, K. und Janetschke, P. (1992). Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene. Fischer Verlag, 1-584.
- Ferrer, M., Chernikova, T. N., Yakimov, M. M., Golyshin, P. N. und Timmis, K. N. (2003). Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nature Biotechnology* **21**(11), 1266-1267.
- Gallien, P., Richter, H., Klie, H., Timm, M., Karch, H., Perlberg, K. W., Steinrück, H., Riemer, S., Djuren, M. und Protz, D. (1997). Detection of STEC and epidemiological investigations surrounding of a HUS patient. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* **110**(9), 342-346.

- Genigeorgis, C. (1995). Biofilms: Their significance to cleaning in the meat sector. *In* Cleaning and disinfection technologies in the meat industry, Burt, S. A., ECCEAMST Foundation, 29-49.
- Gill, C. O. (1979). A review. Intrinsic bacteria in meat. *Journal of Applied Bacteriology* **47(3)**, 367-378.
- Gill, C. O. (2003). Active packaging in practice: meat. *In* Novel food packaging techniques, Ahvenainen, R., Woodhead Publishing, 365-383.
- Gill, C. O. (2004). Spoilage factors affecting. *In* Encyclopedia of Meat Science, Jensen, W. J.; Devine, C. E.; und Dikeman, M., Elsevier Ltd Oxford, 1324-1330.
- Grau, F. H. (1979). Fresh Meats: Bacterial Association. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **30**, 87-92.
- Hauser, C. (2013): Antimikrobiell aktive Verpackungsfolien auf Sorbinsäurebasis und ihre Anwendung bei Lebensmitteln, Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen Nürnberg.
- Heinrich, H., Werner, H. und Seidel, G. (1974). Desinfektion in Lebensmittelbetrieben. *In* Handbuch der Desinfektion und Sterilisation, Band III, Weuffen, W., VEB Verlag Volk und Gesundheit, 399-421.
- Helmer, W. F. (1975). Die Vakuum-, Reife- und Transportverpackung von Rindfleisch. *Fleischerei* **26(10)**, 35-36.
- Helps, C. R., Harbour, D. A. und Corry, J. E. (1999). PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage in vacuum-packed chill-stored beef. *International Journal of Food Microbiology* **52(1-2)**, 57-65.
- Hernández-Macedo, M. L., Barancelli, G. V. und Contreras-Castillo, C. J. (2011). Microbial deterioration of vacuum-packaged chilled beef cuts and techniques for microbiota detection and characterization: a review. *Brazilian Journal of Microbiology* **42(1)**, 1-11.
- Hernández-Macedo, M. L., Contreras-Castillo, C. J., Tsai, S. M., Da Cruz, S. H., Sarantopoulos, C. I. G. L., Padula, M. und Dias, C. T. S. (2012). Gases and volatile compounds associated with microorganisms in blown pack spoilage of Brazilian vacuum-packed beef. *Letters in Applied Microbiology* **55(6)**, 467-475.
- Holzapfel, W. (2003). Mikrobiologie verpackter Fleischerzeugnisse und verpackten Fleisches. *In* Mikrobiologie der Lebensmittel, Fleisch-Fisch-Feinkost, Weber H., 1. Auflage, B. Behr's Verlag, 401-434.

- Hortmann-Scholten, A. (2011). Drehscheibe des Fleischhandels – Strukturentwicklung in der Schweinefleischerzeugung und Vermarktung. *Fleischwirtschaft* **91(10)**, 31-34.
- Husband, P. M. (1982): The history of vacuum packaged meat. *Food Technology in Australia* **34(6)**, 272-275.
- ICMSF (International Commision on Microbiological Specification for Foods of the International Union of Microbiological Societies) (1980). Microbial Ecology of Foods. Vol. 1: Factors affecting life and death of microorganisms, Academic Press.
- Ingram, M. (1952). Internal bacterial taints (bone taint or souring) of cured pork legs. *Journal of Hygiene* **50(2)**, 165-181.
- Jessen, B. und Lammert, L. (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation* **51(4)**, 265-269.
- Jones, R. J. (2004). Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Microbiology* **90(3)**, 273-282.
- Jones, R. J., Zagorec, M., Brightwell, G. und Tagg, J. R. (2009). Inhibition by *Lactobacillus sakei* of other species in the flora of vacuum packaged raw meats during prolonged storage. *Food Microbiology* **26(8)**, 876-881.
- Josephson, K., Gerba, C. und Pepper, I. (1993). Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* **59(10)**, 3513-3515.
- Kalchayanand, N., Ray, B., Field, R. A. und Johnson, M. C. (1989). Spoilage of vacuum-packaged refrigerated beef by *Clostridium*. *Journal of Food Protection* **52(6)**, 424-426.
- Kalchayanand, N., Ray, B. und Field, R. A. (1993). Characteristics of psychrotrophic *Clostridium-laramie* causing spoilage of vacuum-packaged refrigerated fresh and roasted beef. *Journal of Food Protection* **56(1)**, 13-17.
- Keim, H. (1999). Fachwissen Technologie (Modernes Fleischerhandwerk, Band 2), Deutscher Fachverlag GmbH, 78-84 und 111-117.
- Köhne, F. (1996). Veränderte Rahmenbedingungen für die Fleischwarenindustrie. *Fleischwirtschaft* **76(6)**, 586-588.
- Konrad, R. und Busch, U. (2010). PCR und Real-Time PCR. In Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik: Grundlegende Methoden und Anwendungen, Busch, U., Springer-Verlag, 35-46.

- Krämer, J. (2007). Lebensmittel-Mikrobiologie. 5. Auflage, Eugen Ulmer Verlag.
- Labadie, J. (1999). Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science* **52(3)**, 299-305.
- Latz, N., Brombach, C., Eichenauer, G., Gehling, J., Kudick, K.-D., Simon, C., Sprenger, S. und Wiegand, R. (2003). Fleischerei Heute, Grund und Fachstufe. 3. Auflage, Verlag Handwerk und Technik, 1-528.
- Lawson, P., Dainty, R. H., Kristiansen, N., Berg, J. und Collins, M. D. (1994). Characterization of a psychrotrophic *Clostridium* causing spoilage in vacuum-packed cooked pork - Description of *Clostridium algidicarnis* sp. nov. *Letters in Applied Microbiology* **19(3)**, 153-157.
- Lienhop, E. (1974). Das Tiermaterial für die Fleischerzeugung. In Handbuch der Fleischwarenherstellung, 8. Auflage, Günter Hempel Verlag, 17-34.
- Lund, B. M., Graham, A. F., George, S. M. und Brown, D. (1990). The combined effect of incubation-temperature, pH and sorbic acid on the probability of growth of nonproteolytic, type-B *Clostridium-botulinum*. *Journal of Applied Bacteriology* **69(4)**, 481-492.
- Maak, K., Beile, J. und Klein, M. (2006). Zukunft der Fleischwirtschaft. Forschungsprojekt der Hans-Böckler-Stiftung kofinanziert durch die Gewerkschaft NGG; Endbericht. Hamburg. URL:http://www.bzo.de/data_de/downloads_und_seminarmaterialien/downloads/Downloads/Gesamtbericht_Fleisch.pdf (Zugriffsdatum: Februar 2012)
- Mäde, D. (2010). Molekularbiologische Speziesdifferenzierung. In Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik, Busch, U., Springer Verlag, 121-142.
- McBryde, C. N. (1911). A bacteriological study of ham souring. U.S. Bureau of Animal Industry, Bulletin Nr. 132, 55.
- McEvoy, J. M., Doherty, A. M., Finnerty, M., Sheridan, J. J., McGuire, L., Blair, I. S., McDowell, D. A. und Harrington, D. (2000). The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. *Letters in Applied Microbiology* **30(5)**, 390-395.
- McLean, R. A. und Sulzbacher, W. L. (1953). *Microbacterium thermosphactum* spec. nov; a non heat resistant bacterium from fresh pork sausage. *Journal of Bacteriology* **65(4)**, 428-433.
- Mead, G. C. (1992). Principles involved in the detection and enumeration of clostridia in foods. *International Journal of Food Microbiology* **17(2)**, 135-143.

- Moiser, G. (1966). Schlachten. *In* Fleischer-Arbeit. Eine Arbeitslehre in Wort, Bild und Zahl, Moiser, G., 6. Auflage, Westermann Verlag, 61-86.
- Moran, T. und Smith, E. C. (1929). Post-mortem changes in animal tissues - the conditioning or ripening of beef. Department of Scientific and Industrial Research: Food Investigation Special Report, 36. London: H.M.S.O.
- Moschonas, G., Bolton, D. J., Sheridan, J. J. und McDowell, D. A. (2009). Isolation and sources of 'blown pack' spoilage clostridia in beef abattoirs. *Journal of Applied Microbiology* **107(2)**, 616-624.
- Moschonas, G., Bolton, D. J., Sheridan, J. J. und McDowell, D. A. (2010). The effect of storage temperature and inoculum level on the time of onset of blown pack spoilage. *Journal of Applied Microbiology* **108(2)**, 532-539.
- Moschonas, G., Bolton, D. J., Sheridan, J. J. und McDowell, D. A. (2011a). The effect of heat shrink treatment and storage temperature on the time of onset of blown pack spoilage. *Meat Science* **87(2)**, 115-118.
- Moschonas, G., Bolton, D. J., McDowell, D. A. und Sheridan, J. J. (2011b). Diversity of culturable psychrophilic anaerobic bacteria isolated from beef abattoirs and their environments. *Applied and Environmental Microbiology* **77(13)**, 4280-4284.
- Moschonas, G. und Bolton, D. J. (2012). Characterization of a potentially novel 'blown pack' spoilage bacterium isolated from bovine hide. *Journal of Applied Microbiology* **114(3)**, 771-777.
- Mountford, D. O., Rainey, F. A., Burghardt, J., Kaspar, H. F. und Stackebrandt, E. (1997). *Clostridium vincentii* sp. nov., a new obligately anaerobic, saccharolytic, psychrophilic bacterium isolated from low-salinity pond sediment of the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Archives of Microbiology* **167(1)**, 54-60.
- Müller G. und Müller C. (1996). Verfahrensgrundlagen zur Haltbarmachung von Lebensmitteln. *In* Mikrobiologie der Lebensmittel – Grundlagen, 8. Auflage, B. Behr's Verlag, 287-406.
- Neue Verpackung (1970). Verlängerung der Haltbarkeit von Lebensmitteln durch Verpacken unter Vakuum. *Neue Verpackung* **3/1970**, 283-285.
- Newton C. R. und Graham, A. (1997). PCR. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 220.
- Newton, K. G., Harrison, J. C. L. und Wauters, A. M. (1978). Sources of psychrotrophic bacteria on meat at the abattoir. *Journal of Applied Bacteriology* **45(1)**, 75-82.

- North, R. (1995). Cleaning as a causal factor in food poisoning. *In* New Challenges in meat hygiene: specific problems in cleaning and disinfection, Burt, S., Bauer, F., 1. Auflage, ECCEAMST Foundation, 1-8.
- Nottingham, P. M., Penney, N. und Harrison, J. C. L. (1974). Microbiology of beef processing. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **17**, 79-83.
- Peck, M. W., Fairbairn, D. A. und Lund, B. M. (1992). The effect of recovery medium on the estimated heat-inactivation of spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum*. *Letters in Applied Microbiology* **15(4)**, 146-151.
- Pennacchia, C., Ercolini, D. und Villani, F. (2011). Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiology* **28(1)**, 84-93.
- Pflaum, J., Hollwich, W., Röhrmöser, G., Spann, B. und Süss, M. (1992). Rindermast. Eugen Ulmer Verlag, 1-122.
- Pikuta, E. V., Hoover, R. B. und Tang, J. (2007). Microbial extremophiles at the limits of life. *Critical Reviews in Microbiology* **33(3)**, 183-209.
- Pond, M. J., Stone, D. M. und Alderman, D. J. (2006). Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **261(1)**, 194-203.
- Prändl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T. und Sinell, H. J. (1988). Fleisch – Technologie und Hygiene der Gewinnung und Verarbeitung. Eugen Ulmer Verlag.
- Prechter, S., Betz, M., Cerny, G., Wegener, G. und Windeisen, E. (2002). Hygienische Aspekte von Schneidebrettern aus Holz bzw. Kunststoff. *European Journal of Wood and Wood Products* **60(4)**, 239-248.
- Ray, B. und Bhunia, A. (2008). Fundamental food microbiology, 4. Auflage, CRC Press, 491.
- Recke, G., Theuvsen, L., Venhaus, N. und Voss, A. (2011). Entwicklungstendenzen in der Wertschöpfungskette Fleisch. *In* Der Viehhandel in den Wertschöpfungsketten der Fleischwirtschaft: Entwicklungstendenzen und Perspektiven, Recke, G., Theuvsen, L., Venhaus, N., Voss, A., Diskussionspapiere, Hochschule Osnabrück, 6-21.
- Redemaker, J. L. W., Hoolwerf, J. D., Wagendorp, A. A. und te Giffel, M. C. (2006). Assessment of microbial population dynamics during yoghurt and hard cheese fermentation and ripening by DNA population fingerprinting. *International Dairy Journal* **16(5)**, 457-466.

- Reuter, G. (1994). Zur Wirksamkeit von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen bei der Fleischgewinnung und –verarbeitung, Einflußfaktoren und Anwendungsempfehlung. *Fleischwirtschaft* **74(8)**, 808-813.
- Roberts, T. A. und Mead, G. C. (1986). Involvement of intestinal anaerobes in the spoilage of red meats, poultry and fish. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* **13**, 333-349.
- Ronner, A. B. und Wong, A. C. L. (1993). Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. *Journal of Food Protection*, **56(9)**, 750-758.
- Ross, H. E. (1965). *Clostridium putrefaciens*: A neglected anaerobe. *Journal of Applied Microbiology* **28(1)**, 49-51.
- Rudi, K., Nogva, H., Moen, B., Nissen, H., Bredholt, S., Moretro, T., Naterstad, K. und Holck, A. (2002). Development and application of new nuclear acid-based technologies for microbial community analyses in foods. *International Journal of Food Microbiology* **78(1-2)**, 171-181.
- Schaumann, R. und Rodloff, A. (2009). *Clostridium* spp. In Mikrobiologische Diagnostik, Neumeister, B., Geiss, H., Braun, R. und Kimmig, P., 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, 539-550.
- Scheper, J. und Scholz, W. (1985). DLG – Schnittführung für die Zerlegung der Schlachtkörper von Rind, Kalb, Schwein und Schaf, Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e. V., Verlag DLG, Frankfurt am Main, 1-32.
- Schliesser, T. (1981). Grundlagen der Desinfektion. In Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft, Schliesser, T. und Strauch, D., 1. Auflage, Enke Verlag, 1-69.
- Schmidt, U. und Leistner, L. (1981). Reinigung und Desinfektion in der Fleischwirtschaft. In Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft, Schliesser, T., Strauch, D., Ferdinand Enke Verlag, 326-406.
- Setlow, P. und Johnson, E. (2007). Spores and their significance. In Food microbiology: fundamentals and frontiers, Doyle, M. und Beuchat, L., 3. Auflage, ASM Press Verlag, 35-67.
- Shcherbakova, V. A., Chuvilskaya, N. A., Rivkina, E. M., Pecheritsyna, S. A., Laurinavichius, K. S., Suzina, N. E., Osipov, G. A., Lysenko, A. M., Gilichinsky, D. A. und Akimenko, V. K. (2005). Novel psychrophilic anaerobic spore-forming bacterium from the overcooled water brine in permafrost: description *Clostridium algoriphilum* sp. nov. *Extremophiles* **9(3)**, 239-246.

- Silva, A. R., Paulo, É. N., Sant' Ana, A. S., Chaves, R. D. und Massaguer, P. R. (2011). Involvement of *Clostridium gasigenes* and *C. algidicarnis* in blown pack spoilage of Brazilian vacuum-packed beef. *International Journal of Food Microbiology* **148**(3), 156-163.
- Silva, A. R., Tahara, A. C. C., Chaves, R. D., Sant' Ana, A. S., Faria, J. de A. F. und Massaguer, P. R. (2012). Influence of different shrinking temperatures and vacuum conditions on the ability of psychrotrophic *Clostridium* to cause 'blown pack' spoilage in chilled vacuum-packaged beef. *Meat Science* **92**(4), 498-505.
- Sinclair, N. A. und Stokes, J. L. (1964). Isolation of obligately anaerobic psychrophilic bacteria. *Journal of Bacteriology* **87**(3), 562-565.
- Smulders, F. J. M. (2007). Tierproduktion und veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene - ein synoptisches Lehrbuch. 1. Auflage, Wageningen Academic Publishers.
- Spiller, A., Theuvsen, L., Recke, G. und Schulze, B. (2005). Sicherstellung der Wertschöpfung in der Schweineerzeugung: Perspektiven des Nordwestdeutschen Modells, Gutachten im Auftrag der Stiftung Westfälische Landschaft, Georg-August-Universität Göttingen, 1-495.
- Spring, S., Merkhoffer, B., Weiss, N., Kroppenstedt, R. M., Hippe, H. und Stackebrandt, E. (2003). Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov. and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(4), 1019-1029.
- Statistisches Bundesamt (2012). Pressemitteilung Nr. 226 vom 02.07.2012, URL: https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2012/07/PD12_226_413.html (Zugriffsdatum: Mai 2014).
- Statistisches Bundesamt (2013). Pressemitteilung Nr. 056 vom 13.02.2013, URL: https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2013/02/PD13_056_413.html (Zugriffsdatum: Mai 2014).
- Statistisches Bundesamt (2014a). GENESIS-Online Datenbank, URL: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online> (Zugriffsdatum: August 2014).
- Statistisches Bundesamt (2014b). Pressemitteilung Nr. 039 vom 06.02.2014, URL: https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2014/02/PD14_039_413.html (Zugriffsdatum: Mai 2014).
- Sturges, W. S. und Drake, E. T. (1927). A complete description of *Clostridium putrefaciens* (McBryde). *Journal of Bacteriology* **14**(3), 175-179.

- Suetin S. V., Shcherbakova, V. A., Chuvilskaya, N. A., Rivkina, E. M., Suzina, N. E., Lysenko, A. M. und Gilichinsky, D. A. (2009). *Clostridium tagluense* sp. nov., a psychrotolerant, anaerobic, spore-forming bacterium from permafrost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59(6)**, 1421-1426.
- Tändler, K. und Heinz, G. (1970): Frischfleischreifung im Vakuumbbeutel. 1. Mitteilung, *Fleischwirtschaft* **50(9)**, 1185-1190.
- Theuvsen, L. und Recke, G. (2008). Horizontale Kooperationen in der Schlachtschweinevermarktung: Empirische Ergebnisse aus Nordwestdeutschland. In *Zukunftsperspektiven der Fleischwirtschaft*, Spiller, A., Schulze B., Universitätsverlag Göttingen, 73-95.
- top agrar online (2013). Artikel vom 08.02.2013: Milchsäure bald zur Behandlung von Rindfleisch zugelassen, URL: <http://www.topagrar.com/news/Home-top-News-Milchsaeure-bald-zur-Behandlung-von-Rindfleisch-zugelassen-1055957.html> (Zugriffsdatum: Juli 2014).
- Weindlmaier, H., Jantke, C. und Uffelman, W. (2008). Ansatzpunkte für die Umgestaltung der Wertschöpfungskette Fleisch unter den Prämissen Produktsicherheit, Qualitätserhaltung und Umweltfreundlichkeit. In *Zukunftsperspektiven der Fleischwirtschaft*, Spiller, A. und Schulze, B., Universitätsverlag Göttingen, 31-59.
- Wiedenmann, F., Spann, B., Fleischmann, A., Wittkowski, G., Averdunk, G. und Stockinger, C. (1999). Die Landwirtschaft – Tierische Erzeugung. 11. Auflage, BLV Verlagsgesellschaft mbH, 1-702.
- Windhorst (2008). Die Stellung der deutschen Fleischwirtschaft im europäischen und im globalen Rahmen. In *Zukunftsperspektiven der Fleischwirtschaft*, Spiller, A., Schulze B., Universitätsverlag Göttingen, 3-30.
- Yang, X., Balamurugan, S. und Gill, C. O. (2009a). Substrate utilization by *Clostridium estertheticum* cultivated in meat juice medium. *International Journal of Food Microbiology* **128(3)**, 501-505.
- Yang, X., Gill, C. O. und Balamurugan, S. (2009b). Effects of temperature and pH on the growth of bacteria isolated from blown packs of vacuum-packaged beef. *Journal of Food Protection* **72(11)**, 2380-2385.
- Yang, X., Gill, C. O. und Balamurugan, S. (2010a). Products of glucose and lactate fermentation, and utilization of amino acids by *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* and *estertheticum* growing in meat juice medium. *Journal of Food Protection* **73(7)**, 1348-1352.

- Yang, X., Gill, C. O. und Balamurugan, S. (2010b). Enumeration of *Clostridium estertheticum* spores in samples from meat plant conveyors and silage stacks by conventional and real-time PCR procedures. *Internet Journal of Food Safety* **12**, 115-121.
- Yang, X., Balamurugan, S. und Gill, C. O. (2011). Effects on the development of blown pack spoilage of the initial numbers of *Clostridium estertheticum* spores and *Leuconostoc mesenteroides* on vacuum packed beef. *Meat Science* **88(3)**, 361-367.
- Yang, X., Youssef, M. K., Gill, C. O., Badoni, M. und López-Campos, Ó. (2014a). Effects of meat pH on growth of 11 species of psychrotolerant clostridia on vacuum packed beef and blown pack spoilage of the product. *Food Microbiology* **39**, 13-18.
- Yang, X., Wang, H. und Badoni, M. (2014b). Effects of meat pH and the initial numbers of spores of *Clostridium estertheticum* on the development of blown pack spoilage of vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Science and Technology* **49(7)**, 1619-1625.
- Yost, C. K. und Nattress F. M. (2002). Molecular typing techniques to characterize the development of a lactic acid bacteria community on vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Microbiology* **72(1-2)**, 97-105.
- Ziegler, E. (2009): Untersuchungen zum Nachweis und zum Vorkommen von *Clostridium estertheticum* in vakuumverpacktem Rindfleisch, Veterinärmedizinische Dissertation, Tierärztliche Fakultät, LMU München.
- Zitzlmann, A. (2009): Persönliche Mitteilung

Gesetze, Verordnungen und Normen:

DIN 10516 (2009). Deutsches Institut für Normung e. V., Lebensmittelhygiene – Reinigung und Desinfektion. Beuth Verlag.

TierSchG - Deutsches Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), zuletzt geändert durch Artikel 3 des Gesetzes vom 28. Juli 2014 (BGBl. I S. 1308).

IfSG – Infektionsschutzgesetz. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), das durch Artikel 4 Absatz 21 des Gesetzes vom 7. August 2013 (BGBl. I S. 3154) geändert worden ist.

Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene.

(Amtsblatt der Europäischen Union L 139 / 1 vom 30.04.2004)

zuletzt geändert durch: Verordnung (EG) Nr. 1019/2008 vom 17. Oktober 2008 (ABl. EU L 277 S. 7), berichtigt: ABl. EU vom 3.3.2009 Nr. L 58 S. 3

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs.

(Amtsblatt der Europäischen Union L 139 / 55 vom 30.04.2004)

zuletzt geändert durch Artikel 1 ÄndVO (EU) 1137/2014 vom 27. Oktober 2014 (ABl. Nr. L 307 S. 28).

Verordnung (EG) Nr. 450/2009 der Kommission vom 29.05.2009 über aktive und intelligente Materialien und Gegenstände, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen. (Amtsblatt der Europäischen Union L 135 / 3, ber. Amtsblatt der Europäischen Union 2010 L 82 / 3 vom 06.12.2014)

Verordnung (EG) Nr. 1099/2009 des Rates vom 24.09.2009 über den Schutz von Tieren zum Zeitpunkt der Tötung. (Amtsblatt der Europäischen Union L 303 / 1 vom 18.11.2009, ber. 2014 Nr. L 326 S. 6)

Verordnung (EU) Nr. 101/2013 der Kommission vom 04.02.2013 über die Verwendung von Milchsäure zur Verringerung mikrobiologischer Oberflächenverunreinigungen von Rinderschlachtkörpern. (Amtsblatt der Europäischen Union L 34 / 1 vom 04.02.2013)

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Gesamtrinderbestand in Deutschland in Millionen Tiere, von 1990 bis 2014 (Statistischen Bundesamt, 2014a)	4
Abbildung 2: Fleischverzehr je Kopf der Bevölkerung in Deutschland für das Jahr 2013 in Kilogramm, aufgeteilt nach Tierarten (BVDF, 2014)	5
Abbildung 3: Ablauf der Rinderschlachtung im Schlachtstraßensystem (Keim, 1999).....	8
Abbildung 4: Einteilung der Rinderhälfte in die verschiedenen Teilstücke nach der DLG - Schnitfführung (Scheper und Scholz, 1985)	10
Abbildung 5: Beispiel einer vakuumverpackten Rindfleischprobe mit Pack Blowing Score 5 (Etikett geschwärzt)	27
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Ermittlung der Nachweisrate von psychrotoleranten <i>Clostridium</i> spp. in Tropfsaft von Rindfleischproben	57
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Herstellung der Testsuspensionen für die Inokulation verschiedener Oberflächen mit <i>C. estertheticum</i>	59
Abbildung 8: Grundriss von Betrieb A mit gekennzeichneten Probenahmestellen	64
Abbildung 9: Grundriss von Betrieb B mit gekennzeichneten Probenahmestellen	67
Abbildung 10: Grundriss von Betrieb C mit gekennzeichneten Probenahmestellen * : Diese Stellen konnten nur einmal beprobt werden	69
Abbildung 11: Reinkultur von <i>C. bowmanii</i> (DSMZ 14206) auf CBA (20 Tage, +15 °C, anaerob) [A], im Phasenkontrastmikroskop bei 1000 facher Vergrößerung [B] und im Rasterelektronenmikroskop bei 10.000 facher Vergrößerung [C + D]	72
Abbildung 12: Reinkultur von <i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i> (DSMZ 8809) auf CBA (20 Tage, +10 °C, anaerob) [A], im Phasenkontrastmikroskop bei 1000 facher Vergrößerung [B] und im Rasterelektronenmikroskop bei 20.000 facher [C] bzw. 10.000 facher [D] Vergrößerung	73
Abbildung 13: Reinkultur von <i>C. estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i> (DSMZ 14864) auf CBA (28 Tage, +10 °C, anaerob) [A], im Phasenkontrastmikroskop bei 1000 facher Vergrößerung [B] und im Rasterelektronenmikroskop bei 20.000 facher [C] bzw. 10.000 facher Vergrößerung [D]	74

- Abbildung 14:** Reinkultur von einem *C. estertheticum*-like Isolat (C194) auf CBA (20 Tage, +10 °C, anaerob) [A], im Phasenkontrastmikroskop bei 1000 facher [B] und im Rasterelektronenmikroskop bei 20.000 facher [C] bzw. 10.000 facher Vergrößerung [D]..... 75
- Abbildung 15:** Reinkultur von *C. frigoris* (DSMZ 14204) auf CBA (20 Tage, +5 °C, anaerob) [A], im Phasenkontrastmikroskop bei 1000 facher [B] und im Rasterelektronenmikroskop bei 10.000 facher Vergrößerung [C + D] 76
- Abbildung 16:** Reinkultur von *C. gasigenes* (DSMZ 12272) auf CBA (20 Tage, +20 °C, anaerob) [A], im Phasenkontrastmikroskop bei 1000 facher [B] und im Rasterelektronenmikroskop bei 10.000 facher Vergrößerung [C + D]..... 77
- Abbildung 17:** Elektrophoresegel der Amplifikationsprodukte von mit *C. bowmanii*-Keimen (DSMZ 14206) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. bowmanii*, Durchführung Nr. 1 79
- Abbildung 18:** Aufgereinigte Amplifikationsprodukte von mit *C. bowmanii*-Keimen (DSMZ 14206) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. bowmanii* auf einem Chip des Experion Automated Electrophoresis Systems, Durchführung Nr. 1 80
- Abbildung 19:** Elektrophoresegel der Amplifikationsprodukte von mit *C. frigoris*-Keimen (DSMZ 14204) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. frigoris*, Durchführung Nr. 2.... 82
- Abbildung 20:** Aufgereinigte Amplifikationsprodukte von mit *C. frigoris*-Keimen (DSMZ 14204) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. frigoris* auf einem Chip des Experion Automated Electrophoresis Systems, Durchführung Nr. 1 83
- Abbildung 21:** Elektrophoresegel der Amplifikationsprodukte von mit *C. frigoris*-Sporen (DSMZ 14204) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von *C. frigoris*, Durchführung Nr. 1 – 3 85
- Abbildung 22:** Nicht-aufgereinigte Amplifikationsprodukte von mit *C. frigoris*-Sporen (DSMZ 14204) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration

zum Nachweis von <i>C. frigoris</i> auf einem Chip des Experion Automated Electrophoresis Systems, Durchführung Nr. 1	86
Abbildung 23: Elektrophoresegel der Amplifikationsprodukte von mit <i>C. gasigenes</i> -Keimen (DSMZ 12272) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von <i>C. gasigenes</i> , Durchführung Nr. 2	88
Abbildung 24: Aufgereinigte Amplifikationsprodukte von mit <i>C. gasigenes</i> -Keimen (DSMZ 12272) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von <i>C. gasigenes</i> auf einem Chip des Experion Automated Electrophoresis Systems, Durchführung Nr. 1	89
Abbildung 25: Elektrophoresegel der Amplifikationsprodukte von mit <i>C. gasigenes</i> -Sporen (DSMZ 12272) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von <i>C. gasigenes</i> , Durchführung Nr. 1-3	91
Abbildung 26: Nicht-aufgereinigte Amplifikationsprodukte von mit <i>C. gasigenes</i> -Sporen (DSMZ 12272) beimpftem Tropfsaft unterschiedlicher Konzentration zum Nachweis von <i>C. gasigenes</i> auf einem Chip des Experion Automated Electrophoresis Systems, Durchführung Nr. 3	92
Abbildung 27: Ergebnisse des Inokulationsversuches zum Nachweis von Sporen von <i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i> (DSMZ 8809) mittels 16SE-Primerpaar (Broda et al., 2003a) von drei verschiedenen Oberflächen auf einem Elektrophoresegel im Doppelansatz	94
Abbildung 28: Ergebnisse des Inokulationsversuches zum Nachweis von Sporen von <i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i> (DSMZ 8809) mittels EISR-Primerpaar (Broda et al., 2003a) von drei verschiedenen Oberflächen auf einem Elektrophoresegel im Doppelansatz	95
Abbildung 29: Mit Schimmel verunreinigte Knochensäge in Betrieb A.....	96
Abbildung 30: Verschmutzter An- und Ausschalter der Bandsäge in Betrieb A.....	96
Abbildung 31: Grundriss von Betrieb A mit PCR-Befunden zu <i>C. estertheticum</i> / <i>C. estertheticum</i> -like Organismen. Untersuchung der Ausgangssituation. (vgl. Tabelle 24).....	99

Abbildung 32: Grundriss von Betrieb A mit PCR-Befunden zu <i>C. estertheticum</i> , nachdem ein peressigsäurehaltiges Desinfektionsmittel in das Reinigungsmanagement aufgenommen wurde.....	101
Abbildung 33: Grundriss von Betrieb A mit den PCR-Befunden zu <i>C. estertheticum</i> / <i>C. estertheticum</i> -like Organismen (vgl. Tabelle 25).....	103
Abbildung 34: Grundriss von Betrieb B mit den PCR-Befunden zu <i>C. estertheticum</i> / <i>C. estertheticum</i> -like Organismen. Untersuchung der Ausgangssituation (vgl. Tabelle 27).....	106
Abbildung 35: Zerlegeband aus Betrieb C. Durch die Gliederkonstruktion war eine vollständige Reinigung und Desinfektion im Dreischichtbetrieb des Unternehmens nicht durchführbar.....	108
Abbildung 36: Grundriss von Betrieb C mit den PCR-Befunden zu <i>C. estertheticum</i> . Untersuchung der Ausgangssituation.....	110
Abbildung 37: Grundriss von Betrieb C mit den PCR-Befunden zu <i>C. estertheticum</i> nach Vernebelung der Schlacht- und Zerlegehalle mit einem kationischen Polymer aus der Gruppe der Guanidine.....	112
Abbildung 38: Darstellendes Beispiel eines Elektrophoresegels der externen Amplifikationskontroll-PCR nach Gallien et al. (1997) am Beispiel der Amplifikationsprodukte vom Nachweis der Sensitivität der vegetativen Keime von <i>C. bowmanii</i>	170

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Einteilung der Reinigungssubstanzen und ihre Anwendungsgebiete nach Reuter (1994).....	14
Tabelle 2:	Übersicht über im Lebensmittelbereich zur chemischen Desinfektion eingesetzte Wirkstoffgruppen (Bessems, 2003; Brunner et al., 2000; DIN 10516, 2009; Reuter, 1994; Schliesser, 1981).....	15
Tabelle 3:	Einteilung der Mikroorganismen anhand ihres Wachstumvermögens bei unterschiedlichen Temperaturbereichen (Adam et al., 2010; Fehlhaber und Janetschke, 1992; ICMSF, 1980).....	22
Tabelle 4:	Vergleich der Untersuchungsergebnisse verschiedener Studien zu morphologischen Eigenschaften von <i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i> und <i>C. estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i>	25
Tabelle 5:	Pack Blowing Score nach Boerema et al. (2007)	27
Tabelle 6:	Von Fleischproben isolierte psychrotolerante <i>Clostridium</i> spp. mit ihren Wachstumstemperaturbereichen und -optima	31
Tabelle 7:	Koloniemorphologie und Wachstumsoptimum von einigen psychrotoleranten Clostridienspezies	33
Tabelle 8:	PCR-Nachweismethoden für psychrotolerante <i>Clostridium</i> spp. mit ihren Primern, den Zielorganismen und der Länge der jeweiligen Amplifikate	36
Tabelle 9:	Übersicht über alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme.....	38
Tabelle 10:	Überprüfte Betriebe, Anzahl der Probenahmen und Anzahl der auf psychrotolerante Clostridien analysierten Tupferproben.....	40
Tabelle 11:	Herkunft, Anzuchttemperatur und Bebrütungszeit der verwendeten psychrotoleranten <i>Clostridium</i> Referenz-Stämme auf CBA-Platten.....	46
Tabelle 12:	Pipettierschema für die PCR-Systeme zum Nachweis von <i>Clostridium bowmanii</i> und <i>Clostridium frigidum</i>	49
Tabelle 13:	Amplifikationsbedingungen für die PCR-Systeme zum Nachweis von <i>Clostridium bowmanii</i> und <i>Clostridium frigidum</i>	49
Tabelle 14:	Amplifikationsbedingungen für das PCR-System zum Nachweis von <i>Clostridium gasigenes</i>	50

Tabelle 15:	Herkunft und Anzuchtbedingungen der zur Überprüfung der Spezifität verwendeten Bakterienstämme	52
Tabelle 16:	Modifizierungen des Herstellerprotokolls des „High Pure PCR Template Preparation Kit“ (Roche) zur Isolierung von DNA aus Bakterien oder Hefen für die verschiedenen Bakteriengruppen	54
Tabelle 17:	Pipettierschema der eingesetzten Amplifikationskontroll-PCR zur Überprüfung auf inhibitorische Substanzen im Probenmaterial.....	57
Tabelle 18:	Bedingungen für die externe Amplifikationskontroll-PCR	58
Tabelle 19:	Ergebnisse zur Nachweisgrenze des PCR-Systems für vegetative Zellen von <i>C. bowmanii</i> (DSMZ 14206) mit dem Primerpaar CBf/CBr in Fleischtropfsaft	78
Tabelle 20:	Ergebnisse zur Nachweisgrenze des PCR-Systems für vegetative Zellen von <i>C. frigoris</i> (DSMZ 14204) mit dem Primerpaar CFr/CFr in Fleischtropfsaft	81
Tabelle 21:	Ergebnisse zur Nachweisgrenze des PCR-Systems für Sporen von <i>C. frigoris</i> (DSMZ 14204) mit dem Primerpaar CFf/CFr in Fleischtropfsaft	84
Tabelle 22:	Ergebnisse zur Nachweisgrenze des PCR-Systems für vegetative Zellen von <i>C. gasigenes</i> (DSMZ 12272) mit dem Primerpaar 16SDBF/CGr in Fleischtropfsaft	87
Tabelle 23:	Ergebnisse zur Nachweisgrenze des PCR-Systems für Sporen von <i>C. gasigenes</i> (DSMZ 12272) mit dem Primerpaar 16SDBF/CGr in Fleischtropfsaft	90
Tabelle 24:	Ergebnisse der PCR-Untersuchungen der ersten Beprobung von Betrieb A auf <i>C. estertheticum</i> / <i>C. estertheticum</i> -like Organismen und <i>C. frigoris</i>	98
Tabelle 25:	Ergebnisse der PCR-Untersuchungen der dritten Beprobung von Betrieb A auf <i>C. estertheticum</i> / <i>C. estertheticum</i> -like Organismen und <i>C. frigoris</i>	102
Tabelle 26:	Ergebnisse der PCR-Untersuchungen der ersten bis dritten Probenahme von Betrieb A für das Primerpaar 16SEF/16SER	104

Tabelle 27: Ergebnisse der PCR-Untersuchungen der ersten Beprobung von Betrieb B auf <i>C. estertheticum</i> / <i>C. estertheticum</i> -like Organismen und <i>C. frigoris</i>	107
Tabelle 28: Ergebnisse der PCR-Untersuchungen der ersten Beprobung von Betrieb C auf <i>C. estertheticum</i> , <i>C. frigoris</i> und <i>C. gasigenes</i>	109
Tabelle 29: Ergebnisse der PCR-Untersuchungen der beiden Beprobungen von Betrieb C für das Primerpaar 16SEF/16SER.....	113
Tabelle 30: Ergebnisse der verschiedenen Beprobungen von Betrieb A, B und C mit den fünf verschiedenen Primerpaaren.....	113
Tabelle 31: Ergebnisse der Keimzählungen von <i>C. bowmanii</i> mittels Zählkammer nach Thoma zur Ermittlung der Nachweisgrenze des PCR-Systems für vegetative Zellen von <i>C. bowmanii</i> (DSMZ 14206).....	169
Tabelle 32: Ergebnisse der Keimzählungen von <i>C. frigoris</i> mittels Zählkammer nach Thoma zur Ermittlung der Nachweisgrenze des PCR-Systems für vegetative Zellen und Sporen von <i>C. frigoris</i> (DSMZ 14204)	169
Tabelle 33: Ergebnisse der Keimzählungen von <i>C. gasigenes</i> mittels Zählkammer nach Thoma zur Ermittlung der Nachweisgrenze des PCR-Systems für vegetative Zellen und Sporen von <i>C. gasigenes</i> (DSMZ 12272).....	170

11 ANHANG

Tabelle 31: Ergebnisse der Keimzählungen von *C. bowmanii* mittels Zählkammer nach Thoma zur Ermittlung der Nachweisgrenze des PCR-Systems für vegetative Zellen von *C. bowmanii* (DSMZ 14206)

Durchführung Nr.	Keimzahl (gezählte Zellen / ml)
Vegetative 1	$1,3 \times 10^8$
Vegetative 2	$1,3 \times 10^8$
Vegetative 3	$1,6 \times 10^8$
Mittelwert Vegetative	$1,4 \times 10^8$

Tabelle 32: Ergebnisse der Keimzählungen von *C. frigoris* mittels Zählkammer nach Thoma zur Ermittlung der Nachweisgrenze des PCR-Systems für vegetative Zellen und Sporen von *C. frigoris* (DSMZ 14204)

Durchführung Nr.	Keimzahl (gezählte Zellen / ml)
Vegetative 1	$2,7 \times 10^6$
Vegetative 2	$1,9 \times 10^6$
Vegetative 3	$1,9 \times 10^6$
Mittelwert Vegetative	$2,2 \times 10^6$
Sporen 1	$2,1 \times 10^8$
Sporen 2	$2,6 \times 10^8$
Sporen 3	$1,6 \times 10^8$
Mittelwert Sporen	$2,1 \times 10^8$

12 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis, Inhaber des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit des Departments für Veterinärwissenschaften der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, der mir dieses interessante Thema überlassen hat und mir am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Instituts Kulmbach unter seiner damaligen Leitung einen Arbeitsplatz mit hervorragenden Arbeitsbedingungen zur Verfügung gestellt hat.

Bei Herrn J. Kabisch, Max Rubner Institut Kiel, möchte ich mich herzlich bedanken für die kompetente, stets freundliche und zuverlässige Unterstützung sowie die wertvollen Ratschläge während der Durchführung dieser Arbeit und die Mühe bei der Korrektur der Entwürfe.

Ein ganz herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Instituts, Kulmbach, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben und die sich stets kollegial und hilfsbereit zeigten und somit einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Frau Dr. R. Pichner danke ich ganz herzlich für die jederzeit gewährte fachliche Beratung und das gewissenhafte Korrekturlesen der Entwürfe. Mein besonderer Dank gilt Frau L. Weber für die hervorragende Einarbeitung in molekularbiologische Arbeitstechniken und ihre fortwährende fachliche und menschliche Unterstützung, Frau P. Peetz für die Hilfe bei der Anfertigung von rasterelektronenmikroskopischen Präparaten und Frau H. Loske für die Einweisung in die „Lab-on-a-chip“-Technologie und ihre Hilfe. Bei Frau A. Zitzlmann bedanke ich mich für die Entwicklung neuer Primer und ihre fachkundige Hilfe bei den molekularbiologischen Feinheiten.

Ich danke den kooperierenden fleischverarbeitenden Betrieben für das entgegengebrachte Vertrauen und die Ermöglichung der Probenahmen.

Bei Frau Dr. R. Bonke, Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, bedanke ich mich ganz herzlich für ihre Mühe und Geduld und für das sorgfältige und konstruktive Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich möchte mich besonders bei meiner Familie bedanken, die mich zu jederzeit motiviert und unterstützt hat und mir ein Studium der Veterinärmedizin ermöglicht hat. Ich danke meiner Schwester für das Korrekturlesen der englischen Version meiner Zusammenfassung und meinem Freund Johannes für die moralische Unterstützung und die wertvolle Hilfe bei Layoutfragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt der Heinrich-Stockmeyer Stiftung, die mir durch die Vergabe eines Stipendiums die Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit ermöglicht hat.